

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT
IMMUNOLOOGIA OSAKOND

Lehte Türk

Tsütokiinide profiil äsja diagnoositud esimest tüüpi diabeedi haigetel

Magistritöö
Geenitehnoloogia õppekava
30 EAP

Juhendajad: Kalle Kisand, PhD
Viljar Jaks, PhD

TARTU 2017

INFOLEHT

Lühikokkuvõte. Esimest tüüpi diabeet (T1D) on autoimmuunhaigus, mida põhjustavad autoreaktiivsed T-rakud, mis kahjustavad pankrease saarekestes asuvaid insuliini tootvaid rakke. T-rakud ja teised immuunsüsteemi rakud vabastavad erinevat tüüpi väikeseid signaalmolekule, tsütokiine, mis võivad osaleda T1D patogeneesis. Me kasutasime multipleksset tehnoloogiat (xMAP®), et määrata äsja diagnoositud T1D patsientide vereplasmas korraga mitmete tsütokiinide kontsentratsioonid. Saadud andmeid analüüsiti tarkvaraprogrammiga R. Me leidsime, et T1D patsientidel on kõrgenenud kemokiinide ja põletikuvastase retseptori TNF-RII tasemed võrreldes võrdlusgrupiga. Üllatavalt oli noortel T1D haigetel oluliselt madalamad resistiini kontsentratsioonid. Resistiin on hiljuti avastatud adipokiin, mida on pigem seostatud teist tüüpi diabeediga (T2D). Diabeetilisest ketoatsidoosist, mis on üks levinumaid T1D komplikatsioone, iseloomustasid nihked adipokiinide ja loomuliku immuunsuse tsütokiinide tasemetes. Tsütokiinide kohandamisel statistilistes mudelites tuli välja, et nende kontsentratsioonide määramisel tuleks kindlasti arvesse võtta ka kofaktorite, eeskätt verevõtmise aastaaja mõju.

Märksõnad: esimest tüüpi diabeet, tsütokiinid, autoantikehad, HLA, diabeetiline ketoatsidoos, multipleksne analüüs; **CERCS kood:** B500 (immunoloogia)

Abstract. Type 1 diabetes (T1D) is an autoimmune disorder that is characterised by destruction of insulin producing cells in pancreas by autoreactive T-cells. T-cells and other immune cells produce different kind of signal proteins called cytokines. Cytokines could play a potentially pathogenetic role in T1D development. We used multiplex technology (xMAP®) to detect simultaneously multiple cytokines in plasma samples of newly diagnosed T1D patients. The data was analysed using R software. We discovered that young T1D patients had elevated levels of chemokines and anti-inflammatory TNF- α receptor compared to control group. Surprisingly we also found that T1D patients had decreased levels of resistin – a recently discovered adipocytokine that has mostly been linked to type 2 diabetes (T2D). Diabetic ketoacidosis, which is a serious complication of T1D, was characterised by dysregulation of levels of adipokines and cytokines of innate immunity. Adjusting cytokine concentrations for confounders in statistical models revealed that, great attention must be paid to the effect of covariates, especially a seasonal variability of cytokine concentrations.

Keywords: diabetes mellitus type 1, cytokines, autoantibodies, HLA, diabetic ketoacidosis, multiplex assay, seasonal variability; **CERCS code:** B500 (immunology)

SISUKORD

INFOLEHT	2
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	8
1.1 Esimest tüüpi diabeedi diagnoosimine ja sümptomid	8
1.1.1 Esimest tüüpi diabeedi üldisloomustus	8
1.1.2 Esimest tüüpi diabeedi diagnoosimine	8
1.1.2.1 Esimest tüüpi diabeediga seotud ainevahetushäired	10
1.1.2.2 Diabeediga seotud autoantikehad.....	11
1.1.2.3 Esimest tüüpi diabeet ja teised autoimmuunhaigused.....	13
1.2 Esimest tüüpi diabeedi põhjused ja patoloogia	13
1.2.1 Esimest tüüpi diabeedi seos geneetilise taustaga	14
1.5 Tsütokiinid	16
1.5.1 Üldisloomustus – esimest tüüpi diabeet ja tsütokiinid	16
1.5.2 Põletikuga seotud tsütokiinid	18
1.5.2.1 Proinflammatoorsed tsütokiinid ja kemokiinid	18
1.5.2.2 Põletikuvastased tsütokiinid.....	19
1.5.3 Transformeeriva kasvufaktori β (TGF- β) perekond.....	20
1.5.4 Omandatud immuunsusega seotud tsütokiinid.....	20
1.5.5 T-helperite alampopulatsiooni T _H 17-ga seotud tsütokiinid.....	21
1.5.6 Adipokiinid	21
1.5.7 Kasvufaktorid.....	22
1.6 Tsütokiinide kontsentratsioonide määramine ja probleemid	23
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	24
2.1 Uurimistöö eesmärgid.....	24
2.2 Materjal ja meetodika	24
2.2.1 Valimi kirjeldus ja uuringumaterjal	24
2.2.2 Tsütokiinide määramine (xMAP® tehnoloogia)	27
2.2.3 HLA genotüpiseerimine	29
2.2.4 Statistiline analüüs	31
2.3 Tulemused.....	32
2.3.1 Tsütokiinide kontsentratsioonide seos diagnoosiga	32
2.3.2 Tsütokiinide kontsentratsioonide seos diabeetiliste ainevahetushäiretega.....	33
2.3.3 Tsütokiinide kontsentratsioonide seos diabeediga seotud autoantikehadega.....	35
2.3.4 Tsütokiinide kontsentratsioonide seos HLA haplotüüpidega.....	37
2.3.5 Tsütokiinide kontsentratsioonide seos verevõtu aastaagadega.....	39

2.3.6 Mudelid	42
2.3.6.1 Mudelid diagnoosile	42
2.3.6.2 Mudelid ainevahetushäiretele	43
2.4 Arutelu	48
2.5 Järeldused.....	53
KOKKUVÕTE.....	54
SUMMARY.....	55
KASUTATUD KIRJANDUS.....	57
KASUTATUD NETIVIITED	69
LISA 1.....	70
LIHTLITSENTS.....	77

KASUTATUD LÜHENDID

A1C	- glükeeritud hemoglobiin (ingl <i>glycated hemoglobin</i>)
ADA	- Ameerika Diabeedi Assotsiatsioon (ingl <i>American Diabetes Association</i>)
AK	- antikeha (ingl <i>antibody</i>)
AAK	- autoantikeha (ingl <i>autoantibody</i>)
APC	- antigeene esitlevad rakud (ingl <i>antigen presenting cells</i>)
CV	- kordusmääramiste variatsioonikoefitsient (ingl <i>coefficient of variation</i>)
DC	- dentriitrakud (ingl <i>dendritic cells</i>)
DKA	- diabeetiline ketoatsidoos (ingl <i>diabetic ketoacidosis</i>)
ELISA	- ensüümkaudne immunosorptsioonimeetod (ingl <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
EDTA	- etüleendiamiin tetraetaanhappe (ingl <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
FPGT	- paastuglukoosi test (ingl <i>fasting plasma glucose test</i>)
GAD65	- glutamiinhappe dekarboksülaasi isovorm 65 (ingl <i>glutamic acid decarboxylase isoform 65</i>)
GABA	- gamma-aminovõihape (ingl <i>gamma-Aminobutyric acid</i>)
GADA	- GAD65-vastased autoantikehad (ingl <i>GAD65 autoantibodies</i>)
GDM	- rasedusaegne diabeet (ingl <i>gestational diabetes mellitus</i>)
GM-CSF	- granulotsüütide ja monotsüütide kolooniaid stimuleeriv faktor (ingl <i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>)
HLA	- inimese leukotsüüdi antigeen (ingl <i>human leukocyte antigen</i>)
IA-2	- insulinoomiga seotud valk 2 (ingl <i>insulinoma-associated protein 2</i>)
IA-2A	- insulinoomiga seotud valk 2-e vastased autoantikehad (ingl <i>insulinoma-associated protein 2 autoantibodies</i>)
IAA	- insuliini-vastased autoantikehad (ingl <i>insulin autoantibodies</i>)
ICA	- pankrease saarekeste vastased autoantikehad (ingl <i>islet cell autoantibodies</i>)
IFN- γ	- gamma-interferoon (ingl <i>interferon-gamma</i>)
IFG	- paastuglukoosi häire (ingl <i>impaired fasting glucose</i>)
IGT	- glükoositaluvuse häire (ingl <i>impaired glucose tolerance</i>)
IL	- interleukiin (ingl <i>interleukin</i>)
IP-10	- IFN- γ indutseeritud valk 10 (ingl <i>interferon-gamma induced protein 10</i>)
IR	- insuliiniresistentsus (ingl <i>insulin resistance</i>)

LADA	- täiskasvanueas arenev autoimmuune diabeet (ingl <i>latent autoimmune diabetes in adults</i>)
LD	- aheldatuse tasakaalutus (ingl <i>linkage disequilibrium</i>)
MCP-1	- monotsüütide kemoatraktant valk 1 (ingl <i>monocyte chemoattractant protein 1</i>)
MHC	- peamine koesobivuskompleks (ingl <i>major histocompatibility complex</i>)
MFI	- keskmine fluorestsentsi intensiivsus (ingl <i>median fluorescent intensity</i>)
MIP-1 β	- makrofaagide põletiku valk 1 β (ingl <i>macrophage inflammatory protein 1β</i>)
MODY	- noorte küpsuseas algav diabeet (ingl <i>maturity onset diabetes of young</i>)
NGSP	- Rahvuslik Glükohemoglobiini Standardiseerimise Programm (ingl <i>National Glycohemoglobin Standardization Program</i>)
NK-rakud	- loomulikud tapjarakud (ingl <i>natural killer cells</i>)
NOD hiir	- mitterasvunud diabeetiline hiir (ingl <i>non-obese diabetic mouse</i>)
OR	- šansside suhe (ingl <i>odds ratio</i>)
OGTT	- glükoosi taluvustest (ingl <i>oral glucose tolerance test</i>)
PAI-1	- plasminogeeni aktivaatori inhibiitori tüüp 1 (ingl <i>plasminogen activator inhibitor type 1</i>)
PE	- fükoeerütriin (ingl <i>phycoerythrin</i>)
QC	- kontrollproov (ingl <i>quality control probe</i>)
sIL-2R α	- lahustuva interleukiin-2 retseptori α alaühik (ingl <i>soluble interleukin 2 receptor type II alpha subtype</i>)
sTNF-RII	- lahustuva tuumornekroosi faktor α II tüüpi retseptor (ingl <i>soluble tumor necrosis factor receptor type II</i>)
ZnT8	- tsingi transporter 8 (ingl <i>zinc transporter 8</i>)
T1D	- esimest tüüpi diabeet (ingl <i>type 1 diabetes</i>)
T2D	- teist tüüpi diabeet (ingl <i>type 2 diabetes</i>)
Tg	- türeoglobuliin (ingl <i>thyroglobulin</i>)
TGF- β	- transformeeriv kasvufaktor β (ingl <i>transforming growth factor β</i>)
T _H	- T-helper (ingl <i>T-helper cell</i>)
TNF- α	- tuumornekroosi faktor α (ingl <i>tumor necrosis factor α</i>)
TPO	- kilpnäärme mikrosomaalne peroksüdaas (ingl <i>thyroid peroxidase</i>)
WHO	- Maailma Terviseorganisatsioon (ingl <i>World Health Organization</i>)

SISSEJUHATUS

Esimest tüüpi diabeet (T1D – *type 1 diabetes*) on autoimmuunhaigus, mida iseloomustab kõrgeenenud veresuhkru tase. T1D põhjustavad autoreaktiivsed T-rakud, mis ründavad pankreases insuliini tootvaid β -rakke. Juba aastaid enne haiguse avaldumist võib tuvastada T1D haige veres diabeediga seotud autoantikehasid (AAK – *autoantibody*), mille täpne funktsioon seoses diabeediga on hetkel veel teadmata. Liiga kõrge veresuhkru tase ja pea olematu insuliini sekretsioon võib viia eluohtliku seisundi – diabeetilise ketoatsidoosi tekkeni.

Arvatakse, et T1D tekkel mängivad oma osa ka erinevate T-rakkude ja makrofaagide poolt toodetud signaalmolekulid – tsütokiinid. Tsütokiinid võivad kahjustada pankreast nii otseselt kui ka kaudselt (näiteks meelitavad teisi rakke ligi), kuid võivad omada ka kaitsvat toimet (näiteks indutseerivad autoimmuunseid protsesse mahasuruvate regulatoorste T-rakkude arengut). Nihked erinevat tüüpi tsütokiinide tasakaalus võivad viia mitmete autoimmuunhaiguste tekkeni.

Tsütokiinide rolli kohta T1D patoloogias (eeskätt loomudelites) võib kirjanduses leida väga palju viiteid. Inimestes on tsütokiinide mõju vähem uuritud ja tihtipeale on tulemused vastuolulised. Tsütokiinid ei toimi enamasti üksikult, vaid terve võrgustikuna. Seetõttu oleks eriti oluline uurida tsütokiinide koosmõju ehk nende profiili. Järjest enam leiavad tsütokiinide määramisel kasutust multiplekssed meetod, mis võimaldavad ühes vereproovis määrata korraga kuni 100 erineva biomarkeri kontsentratsioonid. See teeb tsütokiinide profiili uurimise oluliselt lihtsamaks. Tsütokiinide määramisel peab olema äärmiselt hoolikas, kuna antud biomarkerite tasemeid võivad tugevasti mõjutada näiteks kellaaeg või aastaag, millal veri võeti, sugu ja ka geneetiline taust. Samuti tuleb olla ettevaatlik tsütokiinide käitlemisel, pikaajalisel säilitamisel ja mitmekordsel proovide ülessulatamisel, kuna nad võivad kergesti laguneda või agregeeruda.

Antud töö eesmärgiks oli uurida äsja diagnoositud esimest tüüpi diabeedi haigete tsütokiinide profiili ja selgitada, kas ja kuidas võivad diabeetilised ainevahetushäired ning autoantikehad tsütokiinide profiilis nihked põhjustada. Samuti vaadeldi, kuidas võiksid tsütokiinide tasemeid mõjutada kofaktorid nagu verevõtu aastaag ja T1D-ga kõige tugevamalt seostuva lookuse, inimese leukotsüüdi antigeeni klass II (HLA-II – *human leukocyte antigen class II*) erinevad alleelid.

Käesolev uuring viidi läbi Tartu Ülikooli meditsiini teaduste valdkonna Bio- ja Siirdemeditsiini instituudi Immunoloogia osakonnas.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Esimest tüüpi diabeedi diagnoosimine ja sümptomid

1.1.1 Esimest tüüpi diabeedi üldiseloostus

Diabeet ehk suhkurtõbi (lad *diabetes mellitus*) on liigsuhkurveresusega kulgev ainevahetushaigus. Diabeet jaguneb erinevateks alavormideks, millest peamisteks loetakse esimest ja teist tüüpi diabeeti (vastaval T1D – *type 1 diabetes* ja T2D – *type 2 diabetes*) ning gestatsioonidiabeeti (GDM – *gestational diabetes mellitus*). Muude alavormide hulka kuuluvad veel näiteks täiskasvanueas arenev autoimmuunne diabeet (LADA - *latent autoimmune diabetes in adults*), mida võib lugeda T1D erijuhuks, ja noorte küpsuseas algav diabeet (MODY - *maturity onset diabetes of young*), kuid neid leidub populatsioonis märgatavalt vähem (ADA, 2014; Stenström *et al.*, 2005).

Esimest tüüpi diabeeti nimetatakse ka noorte suhkurtõveks või insuliinsõltuvaks diabeediks. T1D moodustab kõigist diabeedijuhtudest hinnanguliselt 5%-10% (Maahs *et al.*, 2010). T1D on autoimmuunne haigus, mille korral pöördub immuunsüsteem organismi enda vastu ja asub hävitama pankrease Langerhansi saarekestes paiknevaid insuliini tootvaid β -rakke. Sellest tulenevalt ei suuda organism enam ise insuliini toota (absoluutne insuliinidefitsiit) ja haige vajab eksogeense insuliini süstimist (ADA, 2014).

Esimest tüüpi diabeeti diagnoositakse tavaliselt 10-14-aastastel noortel, kuid järjest enam avaldub see ka vanematel kui 21-aastastel isikutel (Maahs *et al.*, 2010). T1D peamiseks sümptomiks on hüperglükeemia, mis põhjustab janu- ja näljatunde tõusu, uriini hulga suurenemist, nägemishäireid, väsimust ja (vähemalt alguses) ka kehakaalu langust (ADA, 2014). T1D ravimata jätmisel võib tekkida eluohtlik seisund – ketoatsidoos (DKA – *diabetic ketoacidosis*). Ketoatsidoos on ainevahetushäire, mille korral muudavad maksa lagundatud rasvhapped vere happe-aluse tasakaalu happelises suunas üle kriitilise piiri ($\text{pH} < 7,3$; normväärtus 7,35-7,45) (Kitabchi *et al.*, 2004).

1.1.2 Esimest tüüpi diabeedi diagnoosimine

T1D diagnoosimisele eelneb üleüldiselt diabeedi diagnoosimine, mis põhineb, kas glükeeritud hemoglobiini (A1C – *glycated hemoglobin*) või plasmaglükoosi näitajatel. Viimane jaguneb omakorda kaheks – mõõdetakse, kas paastuglükoosi (FPGT – *fasting plasma glucose test*) või 2-tunni plasmaglükoosi taset pärast suukaudset 75 grammi glükoosi manustamist.

Viimast testi kutsutakse ka glükoosi taluvustestiks (OGTT – *oral glucose tolerance test*). Vahel määratakse ka juhusliku glükoosi taset veres. Diabeedi diagnoosi kinnitamiseks piisab vaid ühte tüüpi testist, kuid kindlasti peab tegema kordusmääramisi. Kõik eelmainitud teste kasutatakse nii diabeedi sõeluuringutes kui ka diagnoosimisel, samuti saab nende testide abil tuvastada prediabeeti (ADA, 2015). Diabeedi diagnoosi kriteeriumid on kokkuvõtlikult näha **tabelis 1**.

Tabel 1. Diabeedi diagnoosi kriteeriumid (WHO, 1999).

	Paastuglükoos	2-tunni glükoos
	mmol/l (mg/dl)	mmol/l (mg/dl)
Normväärtus	< 6,1 (< 110)	< 7,8 (< 140)
IFG¹	6,1 - 7,0* (110 - 126)	
IGT²		≥ 7,8 (≥ 140)
Diabeet	≥ 7,0 (≥ 126)	≥ 11,1 (≥ 200)

1 – paastuglükoosi häire (*impaired fasting glucose*), 2 – glükoositaluvuse häire (*impaired glucose tolerance*); *ADA seab IFG piirideks 100-125 mg/dL (5,6-6,9 mmol/l) (ADA, 2015).

Ameerika Diabeedi Assotsiatsioon (ADA – *American Diabetes Association*) lubab diabeedi diagnoosimisel kasutada Rahvusliku Glükohemoglobiini Standardiseerimise Programmi (NGSP - *National Glycohemoglobin Standardization Program*) poolt sertifitseeritud ja standartiseeritud A1C testi. Maailma Terviseorganisatsioon (WHO – *World Health Organization*) aga hetkel veel seda ei tunnusta. A1C test peegeldab glükoosi keskmist kontsentratsiooni veres viimase kahe-kolme kuu jooksul. Diabeedi diagnoosimiseks peab antud testi A1C-väärtus olema $\geq 6,5\%$. Testi plussiks on see, et vere võtmiseks ei pea enne seda vähemalt 8 tundi paastuma. Muud mitte-standardiseeritud A1C testid (nn abi-koha-testid – *point-of-care-tests*) on lubatud ainult T1D monitoorimisel ja raviplaani koostamisel (ADA, 2015).

Hetkel ei ole saadaval mitte ühtegi standardiseeritud kliinilist testi või tuvastatud spetsiifilist tunnust, mille põhjal saaks kindlalt eristada esimest tüüpi diabeeti teist tüüpi diabeedist. ADA toob välja ainult kriteeriumid, kuidas diagnoosida diabeeti, kuid mitte seda, kuidas eristada T1D-d T2D-st (ADA, 2015).

Oluliseks diferentsiaaldiagnostiliseks kriteeriumiks on C-peptiidi kontsentratsioonid, mis erinevad T1D ja T2D haigetel. C-peptiid eraldub endogeense proinsuliini molekuli lõikamisel aktiivseks insuliiniks. Absoluutse insuliini defitsiidiga T1D patsientidel on C-

peptiidi kontsentratsioon alla referentsväärtuse, teist tüüpi diabeedi haigetel, keda iseloomustab insuliiniresistentsus, aga üle normväärtuse. C-peptiid on molekul, mida sekreteeritakse verre insuliiniga ekvimolaarses koguses. C-peptiidi määramist eelistatakse insuliini määramisele, kuna insuliini testimine võtab arvesse ka eksogeense insuliini. See aga ei anna õiget pilti organismi enda insuliini tootmise võimalikest häiretest (Jones *et* Hattersley, 2013).

Erinevalt T2D-st on T1D autoimmuunne haigus, mistõttu võib esimest tüüpi diabeetikutel leiduda mitmeid erinevaid pankrease saarekeste autoantigeenide vastaseid AAK-sid. Siiski ei ole AAK-de määramine T1D diagnoosimise nõue (Atkinson *et al.*, 2014). Umbes 30% äsja diagnoositud T1D patsientidest satub esmakordselt haiglasse just diabeetilise ketoatsidoosi tõttu (Silverstein *et al.*, 2005).

1.1.2.1 Esimest tüüpi diabeediga seotud ainevahetushäired

Diabeetiline ketoatsidoos (DKA) on seisund, mis tekib suhtelise või täieliku insuliinipuudulikkuse foonil ja millega kaasneb hüperglükeemia, atsideemia (vere pH < 7,3), ketonuuria (ketokehade esinemine uriinis) ja sageli ka organismi üldine vedelikupuudus. Diabeetilist ketoatsidoosi seostatakse enamasti äsja diagnoositud T1D patsientidega ja ebakorrekse insuliiniraviga (Tillmann *et* Grünberg, 2003; Lewis, 2000).

Insuliini puudumisel ei suuda koed (nt lihaskude) glükoosi vastu võtta. Sellest tulenevalt võimendab insuliinile vastupidise toimega hormoon glükagoon rasvkoel lagundamist ja glükoneogeneesi. Rasvhapete oksüdeerimise tagajärjel moodustuvad keto kehad – atseetoatsetaat ja β -hüdroksübutüraat, mis muudavad vere happelisemaks. Lisaks põhjustab hüperglükeemia osmootilist diureesi, mille tõttu viiakse rakuväline naatrium, kaalium ja vesi organismist välja (Lewis, 2000; Gosmanov, 2015).

DKA klassikalisteks sümptomiteks on hüperglükeemia, iiveldus, oksendamine, vedelikupuudus ja üleüldine halb enesetunne. Diagnoosi panemine võib olla keeruline, kuna ei teata, et patsiendil on diabeet või maskeerivad teised sümptomid ketoatsidoosi olemasolu. DKA patsiente iseloomustab ka ketootiline hingeõhk, kuna ketoone väljutatakse kehast mitte ainult uriini, vaid ka kopsude teel (Lewis, 2000).

DKA üheks suurimaks probleemiks on vedelikudefitsiitsus, mistõttu tehakse haigele esmasel etapil vedelikuravi: patsiendile manustatakse nii 0,9% naatriumkloriidi kui ka glükoosilahust. Ülekantavale vedelikule lisatakse enamasti ka kaaliumi. Insuliiniravi alustatakse alles pärast vedelikuravi alustamist, kuna viimasega hakkab veresuhkru tase iseenesest vähenema (Tillmann *et* Grünberg, 2003).

1.1.2.2 Diabeediga seotud autoantikehad

Kuigi diabeediga seotud AAK-de määramine ei kuulu ametlikult T1D ametlike diagnoosikriteeriumite hulka, on need siiski hea abimaterjal nii T1D tekke ennustamisel kui ka lisakinnituse saamiseks diferentsiaaldiagnoosil. Hetkel on tuvastatud viis põhilist diabeedi AAK-d, mille hulka kuuluvad pankrease saarekeste vastased autoantikehad (ICA – *islet cell autoantibodies*), insuliini autoantikehad (IAA – *insulin autoantibodies*), insulinoomiga seotud valk 2-e vastased autoantikehad (IA-2A - *insulinoma-associated protein 2 autoantibodies*), glutamiinhappe dekarboksülaasi isovormi 65 vastased autoantikehad (GADA - *GAD65 autoantibodies*) ja hiljuti avastatud tsingi transporter 8 vastased autoantikehad (anti-ZnT8 – *anti-zinc transporter 8*) (Zhang *et* Eisenbarth, 2011). T1D AAK-d tekivad tavaliselt kuid või isegi aastaid enne diabeedi kliiniliste sümptomite esinemist ja võivad olla tuvastatavad lastel alates esimesest eluaastast (Barker *et al.*, 2004).

T1D kõrge riskiga ei ole seotud eelkõige mitte konkreetne AAK tüüp, vaid erinevate diabeedi AAK-de arv. Verge *et al.* viisid läbi uuringu indiviididel, kelle lähisugulased olid T1D haiged. Uuritavatel mõõdeti GADA, IA-2A ja IAA tasemed ja neid jälgiti kuni 11 aastat. Leiti, et T1D risk suurenes iga uue AAK tüübi ilmnemisega. Nendel uuritavatel, kellel tuvastati kaks või rohkem AAK-d, oli viie aasta T1D tekke risk 68%. Nendel uuritavatel, kellel tuvastati kõik kolm AAK-d, oli viie aasta T1D tekke risk lausa 100% (Verge *et al.*, 1996).

Yu *et al.* uuringust järeldub, et AAK-d tekivad mitte kõik korraga, vaid pigem teatud järjekorras. GADA või IAA-d võib detekteerida kõige varem ja hilisemalt tekib IA-2. See, et mitu AAK lõpuks koos esinevad, võib juhtuda väga kiirelt ja eriti just noortel. Enamasti võtab kaksik- või kolmikpositiivsuse teke aega kuid või isegi aastaid (Yu *et al.*, 1996).

Kuigi diabeedi AAK-sid kasutatakse T1D tekke ennustamiseks, siis suure tõenäosusega need AAK-d ise β -rakkude destruktsioonis ei osale. Selle tõestamiseks viidi läbi uuring, kus vaadeldi naisi, kes olid raseduse ajal GADA või IA-2A positiivsed ja seetõttu kandsid platsenta kaudu antud AAK-sid üle ka oma veel sündimata lapsele. Pärast sündi jälgiti neid lapsi, kuid nende hulgas ei tuvastatud diabeediriski suurenemist, vastupidi: AAK-del ilmnis isegi kaitsev efekt (Koczwara *et al.*, 2004).

Pankrease saarekeste vastased autoantikehad (ICA) ja insuliini-vastased autoantikehad (IAA)

ICA avastati kõige varem, kasutades selleks inimese pankrease külmutatud lõiku (Bottazzo *et al.*, 1974). ICA sihtmärgiks on mitmed pankrease saarekeste autoantigeenid nagu

IA-2, GAD ja ZnT8 (Zhang *et Eisenbart*, 2011). ICA määramine kaudse immunofluorestsents meetodiga on keeruline – tulemused kalduvad varieeruma (standardiseerimine raskendatud) ja protsess ise on töömahukas. Lisaks sellele on ICA määramiseks vaja inimese pankrease külmutatud lõiku. Seetõttu määratakse tänapäeval ICA-sid järjest harvem (Zhang *et Eisenbarth*, 2011).

IAA olemasolu näitasid Palmer ja tema kaastöötajad 1983. aastal (Palmer *et al.*, 1983). IAA-d on enamasti esimesed AAK-d, mida tuvastatakse lastel, kellel areneb välja T1D (Hummel *et al.*, 2004) ning IAA tiitrid korreleeruvad negatiivselt T1D avaldumise vanusega (Achenbach *et al.*, 2004). IAA-d on eelkõige kasulikud diabeedi tekke ennustamiseks, kuid pärast rohkem kui kaks nädalalt kestnud insuliiniravi muutub nende mõõtmine mitteinformatiivseks, sest võivad tekkida AK-d süstitud insuliini vastu (Pihoker *et al.*, 2005).

Glutamiinhappe dekarboksülaasi isovormi 65 vastased autoantikehad (GADA)

Glutamiinhappe dekarboksülaas (GAD – *glutamic acid decarboxylase*) on peamine ensüüm, mis osaleb γ -aminovõihappe (GABA – *γ -amino butyric acid*) sünteesis. GABA puhul on tegemist aga inhibitoorse neurotransmitteriga. GAD ja GABA esinevad eelkõige närvirakkudes, kuid huvitaval kombel võib neid samuti leida spetsiifilistes mitte-neuraalrakkudes ja organites nagu pankreas (Reetz *et al.*, 1991; Jun *et al.*, 2002). GAD esineb imetajates kahe isovormina, GAD67 ja GAD65, millest just viimast seostatakse T1D-ga (Zhang *et al.*, 2011).

GADA tiitrid on näidanud korrelatsiooni pikaajaliste diabeedi komplikatsioonidega nagu retinopaatia 15 aastat pärast T1D diagnoosimist (Jensen *et al.*, 2011). GADA abil saab eristada täiskasvanueas arenevat autoimmuunset diabeeti (LADA) T2D-st (Tuomi *et al.*, 1993; Zimmer *et al.*, 1994; Tuomi *et al.*, 1999).

Insulinoomiga seotud valk 2-e vastased autoantikehad (IA-2A)

IA-2 (ehk ICA512) on sekretoorsete graanulite transmembraanne valk, mida ekspresseeritakse nii insuliini tootvates β -rakkudes kui ka teistes peptiide sekreteerivates endokriinsetes rakkudes ja neurosekretoorseid graanuleid sisaldavates neuronites. IA-2A reageerib IA-2 valgu rakusisese osaga. (Solimena *et al.*, 1996).

Äsja diagnoositud T1D lastel, kellel tuvastati ainult IA-2A positiivsus, oli tugevam seos kõrgeriskiliste HLA haplotüüpidega võrreldes nende lastega, kellel tuvastati nii IA-2A, IAA kui ka GADA (Mäkinen *et al.*, 2008). Sosenko *et al.* (2011) avastasid, et T1D kliinilise

progressiooni ajal IA-2A tiitrid suurenevad ja algselt IA-2A negatiivsed patsiendid muutuvad positiivseks.

Tsingi transporter 8 vastased autoantikehad (Anti-ZnT8)

Tsink on vajalik insuliini sekretsiooniks, toimimiseks ja selle talletamiseks rakkudes. Insuliini transporditakse β -rakkude tsütoplasmast vastavatesse sekretoorsetesse graanulitesse *SLC30A* tsink-transporterite kaasabil. ZnT8-t ekspresseeritakse spetsiifiliselt pankrease β -rakkudes ning aastal 2007 tuvastati, et tegu on ühe põhilise T1D autoantigeeniga (Wenzlau *et al.*, 2007). Anti-ZnT8 ennustab T1D riski, sõltumata teistest diabeedi AAK-dest, vanusest ja HLA riskigrupist ning selle lisamine T1D ennustamise ja ennetamise uuringutesse on mõistlik (Yu *et al.* 2009). Long *et al.* (2012) leidsid samuti, et ZnT8A on kasulik T1D riskimarker, kuid seda peamiselt madala geneetilise riskiga ja vanematel kui 20-aastastel indiviidel.

1.1.2.3 Esimest tüüpi diabeet ja teised autoimmuunhaigused

Tihti peale esineb esimest tüüpi diabeet koos teiste autoimmuunhaigustega, näiteks autoimmuunse türeoidiidi, tsöliaakia või Addisoni tõvega (Taplin *et al.*, 2008). Kilpnäärme mikrosomaalse peroksüdaasi (TPO - *thyroid peroxidase*) vastased AAK-d ja türeoglobuliini (TG - *thyroglobulin*) vastased AAK-d ilmestavad autoimmuunste kilpnäärmehaiguste haiguspilti ning neid leidub umbes ühel kolmandikul T1D patsientidest (Umpierrez *et al.*, 2003). Eelmainitud AAK-d on rohkem levinud naiste seas (nagu ka üldiselt autoimmuunhaigused). Seetõttu soovitatakse T1D patsientidel aeg-ajalt testida asümptomaalse kilpnäärme düsfunktsiooni võimalikkust (Umpierrez *et al.*, 2003; Barker *et al.*, 2005). anti-TPO tiitrid on tugevalt seotud vanuse ja diabeedi kestvusega – suurema tõenäosusega esinevad nad indiviidel, kellel avaldus T1D vanemas eas või indiviidel, kes on juba pikka aega T1D-d põdenud (Kordonouri *et al.*, 2002).

1.2 Esimest tüüpi diabeedi põhjused ja patoloogia

T1D tekke täpseid patoloogilisi mehhanisme ei teata. Arvatakse, et T1D on multifaktoriaalne haigus, kus kombineeruvad geneetiline taust ja keskkonnafaktorid, mis initsieerivad β -rakkude autoimmuunse hävimise ja samuti osalevad haiguse progresseerumise edasistes mehhanismides (Christoffersson *et al.*, 2016). Geneetiline taust mängib T1D tekkel

väga suurt rolli. Uuring, mis võrdles T1D teket ühemunakaksikute seas, näitas, et 40% juhtudest haigestusid mõlemad kaksikutest T1D-sse (Barnett *et al.*, 1981).

β -rakkude täielik hävimine viib lõpuks absoluutse insuliniipuudulikkuseni (Yoon *et Jun*, 2005). T1D tekkimisel on kaks eristatavat staadiumit – insuliit, mida iseloomustab leukotsüütide infiltratsioon pankrease saarekestesse, ja diabeedi staadium, kus suurem osa β -rakkudest on hävinenud. Viimase tõttu ei toodeta enam piisavalt insuliini, mis reguleeriks glükoositaset veres ning tekib hüperglükeemia. Insuliit võib kesta aastaid, enne kui avaldub T1D. Mõnikord aga insuliit T1D-ks ei progresseerugi (Mathis *et al.*, 2001).

T1D patogeneesi on peamiselt uuritud T1D loomudelitel peal, milleks on mitterasvunud diabeetilised hiired (NOD - *non-obese diabetic*). Äsja diagnoositud T1D patsientide pankrease histoloogilisi analüüse on tehtud vähe, kuid on näidatud, et pankrease Langerhansi saarekestesse toimub immuunrakkude infiltratsioon. (Yoon *et Jun*, 2005; Gepts *et Lecompte*, 1981).

Makrofaagid ja dentriitrakud (DC – *dendritic cell*) on esimesed rakutüübid, mis infiltreerivad pankrease saarekesi. Neile järgnevad T-lümfotsüüdid, loomulikud tapjarakud (NK-rakud – *natural killer cells*) ja B-lümfotsüüdid. β -rakkude suhtes autoreaktiivsete T-rakkude teket initsieerivad arvatavasti APC-d (antigeeni esitlevad rakud – *antigen presenting cells*), mis töötlevad β -rakkude autoantigene pankrease saarekestes. Seejärel APC-d migreeruvad regionaalsetesse lümfisõlmedesse, kus nad esitavad autoantigene naiivsetele autoreaktiivsetele T-rakkudele (Yoon *et Jun*, 2005).

Peamise koesobivuskompleksi klass II (MHC - *major histocompatibility complex*) spetsiifilised CD4+ T-rakud ja MHC-I spetsiifilised CD8+ T-rakud mängivad olulist rolli T1D patogeneesis NOD hiirtes, kuid nende täpne roll inimese T1D tekkel on siiaani veel teadmata. Enamasti on vaja CD4+ T-rakke, et CD8+ T-rakud värvata pankrease saarekestesse ning samuti nende aktivatsiooniks. Ka T-rakkude poolt toodetud tsütokiinid osalevad T1D patogeneesis. Üldiselt, soodustavad T_H1 tsütokiinid (IL-2, IFN- γ ja TNF- β) diabeedi arengut, samas kui T_H2 või T_H3 tsütokiinid (IL-4, IL-10 ja TGF- β) hoiavad ära T1D tekke. T-rakkude poolt toodetud tsütokiinid aitavad kaasa β -rakkude apoptoosile (Yoon *et Jun*, 2005).

1.2.1 Esimest tüüpi diabeedi seos geneetilise taustaga

T1D teket mõjutab tugevalt geneetiline komponent. Seda ilmestab nähtus, et lapsel, kelle esimese astme sugulane põeb T1D-d, on risk haigestuda 20. eluaastaks ise T1D-sse 5%. Samas kui üleüldises populatsioonis, kus lapsel pole ühtegi haigetunud sugulast, on T1D risk ainult 0,3% (Noble *et Valdes*, 2011).

Kaheks peamiseks kromosomaalseks regiooniks, mida seostatakse T1D-ga, loetakse HLA regiooni kromosoomil 6p21.3 ja insuliini geeni regiooni kromosoomil 11p15 (Pociot *et* McDermott, 2002). HLA seos T1D-ga avastati juba 1970ndatel (Singal *et* Blajchman, 1973). HLA-ga saab ära seletada 40%-50% ulatuses T1D päriliku tekkepõhjuse (Risch, 1987; Noble *et al.*, 1996). MHC (inimesel HLA) regiooni geenid jagunevad nelja perekonda – I, II, III ja IV. Statistiliselt on kõige tugevam seos HLA klass II (-DP, -DQ, -DR) alleelidega. Klass II HLA geenid kodeerivad molekule, mis osalevad antigeenide esitlemises CD4+ T-rakkudele (Pociot *et* McDermott, 2002).

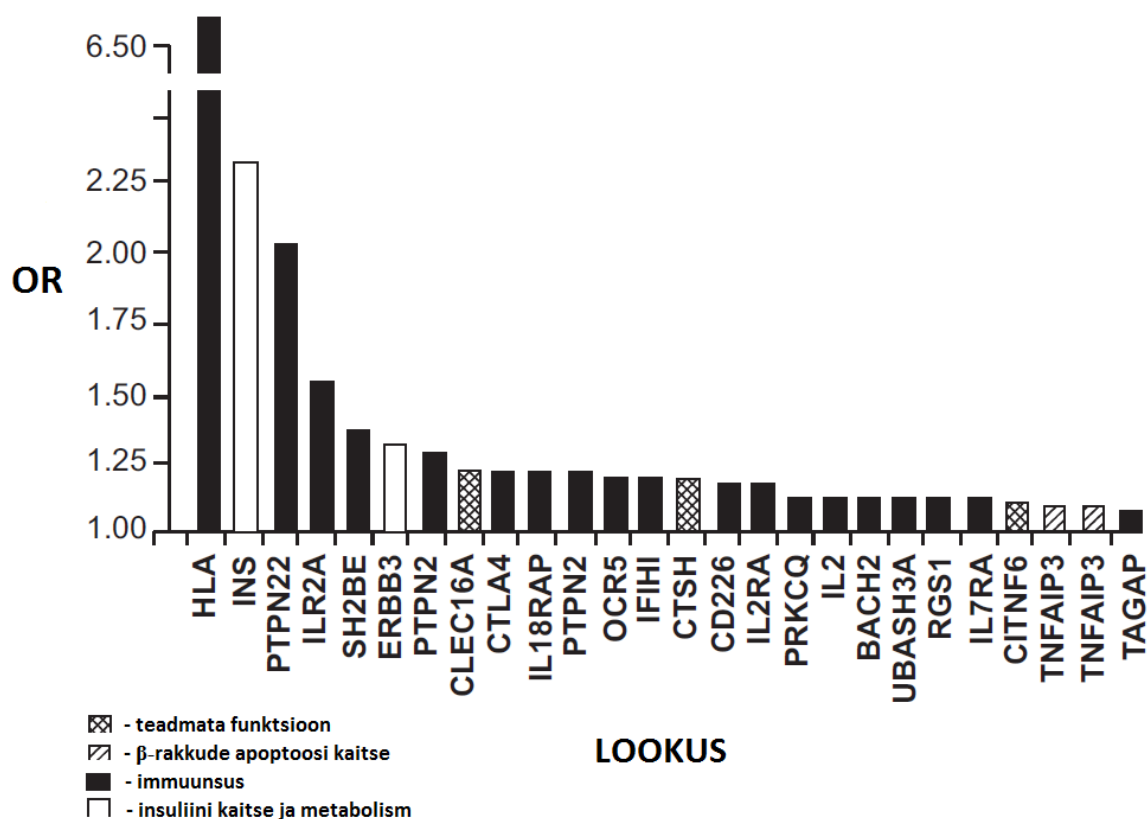
Nii loomudelitel kui ka inimeste uuringutest tuleb välja, et peamised lookused, mis soodustavad T1D teket, on HLA-DQA1, -DQB1 ja -DRB1. HLA lookuse naabergeenide vahel on aga tugev aheldatuse tasakaalutus (LD – *linkage disequilibrium*) ja mitmed geenid toimivad samal ajal, mistõttu on neid üksikult väga keeruline uurida (Pociot *et* McDermott, 2002).

On selge, et mõned HLA alatüübid põhjustavad suuremat geneetilist eelsoodumust kui teised. Näiteks kõrge riskiga on DQ8-t ja DQ2-te sisaldavad DQA1*03-DQB1*03:02 ja DQA1*05-DQB1*02 kombinatsioonid, kuid eelkõige just HLA-DQ2/DQ8 heterosügootid (Pociot *et* McDermott, 2002). Umbes 30% T1D patsientidel on HLA DQ2/DQ8 kombinatsioon (Thomson *et al.*, 1988). HL-DQ6 molekulil, mida kodeerib HLA-DQA1*01:02-DQB1*06:02, on aga tugevad kaitsvad omadused. Seda isegi siis, kui patsiendil on tuvastatud T1D-ga seotud kõrgeriskilised HLA alleelid ja/või AAK-d (Pugliese *et al.*, 1995).

HLA DR-DQ haplotüübid, mis põhjustavad suurimat T1D riski, on DRB1*03:01-DQA1*05:01-DQB1*02:01 (lühend DR3) ja DRB1*04:01/02/04/05/08-DQA1*03:01-DQB1*03:02/04 (või DQB1*02; lühend DR4). Haplotüüpide põhjal tekivad genotüübid ja T1D risk on võrreldes DR4/DR4 või DR3/DR3 homosügootidega märkimisväärselt suurem, kui moodustuvad DR3/DR4 heterosügootid. Haplotüüp DRB1*15:01-DQA1*01:02-DQB1*06:02 (lühend DR2) avaldab aga tugevat kaitset T1D-sse haigestumisel. (Noble *et* Valdes, 2011). Kokkuvõtlikku tabelit T1D-ga seostatud HLA haplotüüpidest ja nende põhjal moodustunud genotüüpidest võib näha alateema 2.2.3 all (**tabelid 5 ja 6**).

Arvatakse, et HLA alleelide erinevat riski põhjustab DRB1 molekuli peptiidiga seonduvate taskute P1 ja P2 erinev struktuur ja toime (Cucca *et al.*, 2001). Erinevat riski võivad põhjustada ka spetsiifilised aminohappejäägid, mis osalevad MHC II klassi molekuli peptiidiga seondumisel. Konkreetset seostatakse T1D riskiga aminohappejääki 57, mis asub HLA-DQB1 molekuli üheksandas „taskus“. Kui 57. positsioonis asub aspartaat, siis kodeerib HLA-DQB1 kaitsvat alleeli. Kui antud positsioonis on aga valiin, seriin võialaniin, kodeeritakse T1D eelsoodumusega alleeli (Pociot *et* McDermott, 2002).

Lisaks ülaltoodule seostatakse T1D-ga üle 50 kromosomaalse regiooni, kuid nende panus antud haiguse tekkesse on oluliselt väiksem. Muude T1D riskigeenide hulka kuuluvad näiteks PTPN22, CTLA-4 ja CD25 (IL-2 retseptor) (Pociot *et* McDermott, 2002) (**joonis 1**).



Joonis 1. T1D riskiga seotud geenilookused. OR – šansside suhe (*odds ratio*); (Zhang *et al.*, 2011).

1.5 Tsütokiinid

1.5.1 Üldiseloomustus – esimest tüüpi diabeet ja tsütokiinid

Tsütokiinid on väikeste sekreteerivate signaalvalkude üldnimetus, mis vahendavad immuunvastuse käigus kommunikatsiooni rakkude vahel. Need mõjutavad paljusid rakkude elutegevuse aspekte (aktivatsioon/supressioon, paljunemine/diferentseerumine). Tsütokiinid toimivad läbi spetsiifiliste retseptoritega seondumise. Praeguseks on teada sadu erinevaid tsütokiine ja neid avastatakse järjest juurde (Uibo *et al.*, 2015).

Tsütokiinid on põhilised mediaatorid, mis osalevad põletiku tekkes. Nad juhivad loomuliku ja omandatud immuunsüsteemi vastuseid ning mängivad olulist rolli koekahjustustes, nende paranemises, kaitses ja ümbermodelleerimises (Uibo *et al.*, 2015).

Tsütokiinidel on muuhulgas tähtis roll ka T1D kujunemisel (**tabel 2**). Tsütokiinid võivad osaleda nii otseselt kui ka kaudselt T1D tekkes (Herrath *et al.*, 1997). Samuti on kirjeldatud tsütokiine, mis omavad T1D kontekstis pigem kaitsevat efekti, näiteks indutseerivad reguleerivate T-rakkude arengut (Gaudreau *et al.*, 2007) või suruvad alla T_H1 alatüübi ja proinflammatoorsete tsütokiinide produktsiooni (Souza *et al.*, 2008). Tsütokiinide seost T1D-ga on uuritud arvukalt nii loomudelites kui ka inimestes, kuid tihtipeale on erinevate uuringute tulemused olnud mitte järjepidevad või lausa vastupidised. Enamikel juhtudel on vaadeldud ainult üksikute tsütokiinide esinemist T1D patsientidel, samas kui mitmete tsütokiinide koosesinemisele ehk tsütokiinide profiilile on vähem tähelepanu pööratud.

Uute multiplekssete meetodite kasutuselevõtmine on võimaldanud järjest enam viia läbi ka uuringuid, kus vaadeldakse tsütokiinide kui võrgustiku rolli teatud autoimmuunhaiguste korral. Multiplekssete meetodite (näiteks Luminex) eeliseks traditsioonilise ensüümkaudse immunosorpstsiionimeetodi (ELISA - *enzyme-linked immunosorbent assay*) ees ongi mh võimalus määrata ühes proovis mitmete erinevate analüütide kontsentratsioonid korraga, mis teeb määramisprotsessi olulisemalt lihtsamaks, kiiremaks ja ka odavamaks (Jager *et al.*, 2009).

Tabel 2. Tsütokiinide funktsioon seosed T1D-ga ja valik artikkelitest.

Tsütokiin	Funktsioon (seoses T1D-ga)	T1D-ga seotud tööd
Adipokiinid: resistiin, PAI-1	veresoonkonnahaigused	Adly <i>et al.</i> , 2014
Kemokiinid: IP-10 (CXCL10), MCP-1 (CCL2), MIP-1β (CCL4), IL-8 (CXCL8)	erinevad põletikulised protsessid \uparrow	Shimada <i>et al.</i> , 2001; Zineh <i>et al.</i> , 2009; Ismail <i>et al.</i> , 2016; Erbagci <i>et al.</i> , 2001; Chatzigeorgiou <i>et al.</i> , 2010
Kasvufaktorid: GM-CSF, IFN-γ, IL-2, sIL-2Rα	IL-2, IFN- γ – β -rakkude destruktsioon; GM-CSF – DC ja T _{reg} \uparrow	Gaudreau <i>et al.</i> , 2007; Tang <i>et al.</i> , 2008; Herrath <i>et al.</i> , 1997
Proinflammatoorsed: IL-1β, IL-6, TNF-α	põletik \uparrow ; β -rakkude otsene kahjustamine	Toyoda <i>et al.</i> 1994; Southern <i>et al.</i> , 1990; Corbett <i>et al.</i> , 1992; Uno <i>et al.</i> , 2007; Kristiansen <i>et al.</i> Mandrup-Poulsen, 2005.
Põletikuvastased: IL-13, IL-10, sTNF-RII	põletik \downarrow	Zacone <i>et al.</i> , 1999; Nitta <i>et al.</i> , 1998
Omandatud immuunsus: IL-12, IL-5	T _H 1-T _H 2 tasakaal	Katz <i>et al.</i> , 1995; Tran <i>et al.</i> , 2012; Trembleau <i>et al.</i> , 2012
TGF-β perekond: TGF-β1, TGF-β2	diabeetiline nefropaatia, T1D kaitse (Treg \uparrow)	Chen <i>et al.</i> , 2001; Gregg <i>et al.</i> , 2004; Lin <i>et al.</i> , 2009; Yadav <i>et al.</i> , 2011

T_H17 tsütokiinid: IL-23, IL-15, IL-17A, IL-17F	T _H 17 rakkude proliferatsioon, autoimmuunsus	Marwaha <i>et al.</i> , 2010; Honkanen <i>et al.</i> , 2010
--	--	---

1.5.2 Põletikuga seotud tsütokiinid

1.5.2.1 Proinflammatoorsed tsütokiinid ja kemokiinid

Proinflammatoorsed tsütokiinid ja kemokiinid mängivad väga olulist osa autoimmuunhaiguste patogeneesis. Klassikalised proinflammatoorsed tsütokiinid on interleukiin-6 (IL-6 – interleukin 6), IL-1 β ja tuumornekroosi faktor α (TNF- α - *tumor necrosis factor* α). Põletikku soodustavaid tsütokiine toodavad mononukleaarsed fagotsüüdid vastusena mitmesugustele ohusignaalidele. IL-1 ja TNF-i toime on sarnane: madalas kontsentratsioonis on nad lokaalse põletiku mediaatorid, suures koguses aga pääsevad nimetatud tsütokiinid tsirkulatsiooni ja põhjustavad süsteemset põletikku (Uibo *et al.*, 2015). IL-6 on pleiotroopne tsütokiin. Kuigi algselt arvati, et antud tsütokiin indutseerib ainult põletiku teket, siis tänaseks on leitud, et IL-6 osaleb nii põletiku indutseerimises kui ka selle supresseerimises. Muuhulgas on IL-6 ka müokiin (lihasrakkude poolt sekreteeritav tsütokiin), mida sekreteeritakse väga suurtes kogustes just kehalise aktiivsuse ajal (Kristiansen *et Mandrup-Poulsen*, 2005).

IL-1 β ja TNF- α ekspressiooni võib detekteerida insuliidi varajases staadiumis (Toyoda *et al.*, 1994). Mõlemad tsütokiinid inhibeerivad β -rakkude insuliini sekretsiooni (Southern *et al.*, 1990). Corbett *et al.* (1992) leidsid, et IL-1 β indutseerib NO-de teket pankrease saarekestes, mis aitab kaasa β -rakkude kahjutuste tekkele. Makrofaagid ja dentriittrakud on võimelised infiltreeruma pankrease saarekestesse ja toodavad selle käigus tsütokiine IL-1 β ja TNF- α (Uno *et al.*, 2007). IL-6 seoseid T1D-ga inimeses on vähe uuritud, enamik katseid on tehtud NOD hiirte peal ning saadud tulemused on olnud vastuolulised. Siiski arvatakse, et IL-6 funktsioon on T1D korral patogeenne, kuid antud tsütokiin üksinda ei suuda indutseerida β -rakkude hävitamist – vaja on ka muid faktoreid, näiteks teiste põletikutsütokiinide kohalolu (Kristiansen *et Mandrup-Poulsen*, 2005).

Kemokiinid ehk kemotaktilised tsütokiinid moodustavad suure perekonna homologseid valke, mis kõik osalevad leukotsüütide liikumise regulatsioonis. Nad vahendavad erinevaid ligandi kontsentratsioonigradiendi kaudu realiseeruvaid bioloogilisi protsesse nagu extravasatsioon, pikkuskasv, haavade paranemine ja patoloogiatest kasvajate metastaseerumine. Kemokiine klassifitseeritakse struktuuri järgi, kuid jätkuvalt võib

kirjandusest leida ka nende vanemaid, funktsioonist tulenevaid nimetusi (nt CCL2 ehk monotsüütide kemoatraktant valk 1 [MCP-1 - *monocyte chemoattractant protein 1*]). Kemokiinid toodavad peamiselt põletiku käigus aktiveeritud leukotsüüdid ja kudedes olevad rakud (endoteelirakud, fibroblastid ja epiteelirakud) (Uibo *et al.*, 2015).

Mitmed uuringud on leidnud, et T1D patsientidel on suurenenud erinevat tüüpi kemokiinide kontsentratsioonid. Näiteks Shimada *et al.* avastasid, et T1D patsientidel on kõrgeenenud seerumi IFN- γ indutseeritud valk 10 (IP-10 - *interferon-gamma induced protein 10*) (CXCL10) kontsentratsioon võrreldes kontrollgrupiga. IP-10 indutseerib muuhulgas T_H1 rakkude migratsiooni lokaalsetesse kolletesse, mistõttu võiks antud kemokiin olla pankrease saarekestes hea marker T_H1 rakkude aktiivsuse hindamiseks (Shimada *et al.*, 2001). Lisaks on leitud, et T1D patsientidel on samuti suurenenud IL-8 (CXCL8), MCP-1 (CCL2) ja makrofaagide põletiku valk 1 β (MIP-1 β - *macrophage inflammatory protein 1 β*) (CCL4) tase, mis kokkuvõtlikult viitab põletikuliste protsesside olemasolule (Zineh *et al.*, 2009; Ismail *et al.*, 2016; Erbagci *et al.*, 2001, Chatzigeorgiou *et al.*, 2010).

1.5.2.2 Põletikuvastased tsütokiinid

Põletikuvastased tsütokiinid tasakaalustavad proinflammatoorsete tsütokiinide vastust, et vältida liigse põletiku teket. IL-13 ja IL-10 on ühed põhilised põletikuvastased tsütokiinid (Opal *et DePalo*, 2000).

Zaccone *et al.* uurisid, kuidas mõjutab inimese rekombinantse IL-13 (hIL-13) manustamine NOD hiirtele nende haigestumist T1D-sse. Antud uurimus leidis, et hIL-13 vähendas oluliselt NOD hiirte spontaanset haigestumist T1D-sse, mis viitab sellele, et IL-13 kuulub tsütokiinide hulka, mis on võimelised, alla reguleerima diabeediga seotud põletikulisi radu. Samuti toetavad tulemused kontseptsiooni, et T_H2-ga seotud tsütokiinid võivad ära hoida T1D tekke (Zaccone *et al.*, 1999). Pankrease põletiku vähendamisega on seotud ka peamiselt reguleerivate T-rakkude poolt toodetud IL-10. Nitta *et al.* (1998) süstisid NOD hiirtele IL-10-t sisaldavat ekspressiooniplasmiidi ja kuigi ravi ei mõjutanud insuliidi kulgu, siis võrreldes mitte-ravitud hiirtega vähenes ravitutel diabeedijuhtude arv.

Põletiku regulatsiooniga seostatakse ka tsütokiinide retseptoreid. Inimeses esinevad nii membraaniga seotud (osaleb signaalide vahendamisel) kui ka lahustuvaid (paiknevad rakkude vahelises vedelikus) TNF- α tüüp 1 ja tüüp 2 retseptorid ((s)TNF-RI – p55 ja (s)TNF-RII – p75) (Opal *et DePalo*, 2000). Lahustuvad retseptorid võistlevad membraan-seoselistega TNF- α sidumisel. Seetõttu käituvad TNF- α sekretoorsed retseptorid suurtes kogustes kui spetsiifilised TNF- α inhibiitorid (Van Zee *et al.*, 1992). Samas, teatud juhtudel võib sTNF-RII käituda pigem

TNF- α agonisti kui antagonistina. sTNF-RII võib seostuda tsirkuleeriva TNF- α -ga ja pikendada tema ringlemise eluiga. TNF- α aga suudab sTNF-RII küljest kergesti dissotsieeruda ning seetõttu võib lõpp-tulemiks olla TNF- α mõju pikenemine, millel võivad olla potentsiaalselt kahjulikud tagajärjed (Mohler *et al.*, 1993).

1.5.3 Transformeeriva kasvufaktori β (TGF- β) perekond

Transformeeriva kasvufaktori β (TGF- β - *transforming growth factor β*) perekonna põhifunktsiooniks immuunsüsteemi seisukohalt on immuunrakkude proliferatsiooni ja aktivatsiooni pidurdamine. TGF- β perekonda kuuluvad TGF- β 1, TGF- β 2 ja TGF- β 3. TGF- β toodetakse prekursorina ja see aktiveeritakse Golgi kompleksis proteolüütilise lõikamise teel. Küps TGF- β sekreteeritakse latentses vormis kompleksis teiste polüpeptiididega. Viimased tuleb TGF- β küljest eemaldada enne, kui TGF- β saab seonduda oma retseptoritega ja avaldada bioloogilist toimet (Uibo *et al.*, 2015; Abbas, 2015).

TGF- β indutseerib (koos IL-23 ja IL-1 β -ga) T_H17 rakkude diferentseerumist. TGF- β indutseerib ka regulatoorsete T-rakkude arengut naiivsetest T-rakkudest. Regulatoorsed T-rakud omakorda produtseerivad nii tsütokiini TGF- β kui ka IL-10, millega kontrollitakse T-rakkude vastust, et ära hoida autoimmuunsete reaktsioonide teket (Korn *et al.*, 2009; Uibo *et al.*, 2015).

TGF- β /Smad3 aktivatsioonirada reguleerib insuliini tootmist pankrease β -rakkudes ja rasvkoe ainevahetust ning selle rajaga seostatakse diabeedi pikaajalise komplikatsiooni – diabeetilise nefropaatia teket (Chen *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2009; Yadav *et al.*, 2011).

1.5.4 Omandatud immuunsusega seotud tsütokiinid

Omandatud immuunvastusega tsütokiinide hulka liigituvad sellised tsütokiinid, mis reguleerivad lümfotsüütide proliferatsiooni ja diferentseerumist antigeeni äratundmise ja esitamise järel. Need tsütokiinid vastutavad ka efektorrakkude arenemise aktivatsiooni eest ning mitmed neist suunavad lümfotsüütide alapopulatsioonide (T_H1, T_H2, T_H17, T_{reg} jt) arengut. Lisaks IL-12-le ja IL-5-le, kuuluvad siia veel ka näiteks gamma-interferoon (IFN- γ – *interferone-gamma*), IL-2, TGF- β ja erinevad T_H17 rakkude sekreteeritavad tsütokiinid (Uibo *et al.*, 2015).

CD4⁺ T-helperrakud jagunevad alampopulatsioonideks sõltuvalt sellest, milliseid transkriptsioonifaktoreid nad oma pinnal ekspresseerivad ja milliseid tsütokiine nad sekreteerivad. T_H1 rakkude diferentseerumist indutseerib IL-12 koos IFN- γ -ga ja antud

alampopulatsioon produtseerib tsütokiine IFN- γ , IL-2 ja TNF- α . T_H2 rakkude diferentseerumist indutseerib peamiselt IL-4 ja nad toodavad tsütokiine IL-4, IL-5 ja IL-13 (Abbas, 2015).

Korrelatsiooniuringud pankrease saarekeste tsütokiinide ekspressiooni ja T1D teke vahel NOD hiirtes on näidanud, et β -rakke kahjustava insuliidi korral on üles reguleeritud T_H1 alatüübi tsütokiinid (IFN- γ , TNF- β , IL-2, IL-12). Samas healoomulise insuliidi korral, mil β -rakke ei kahjustata, on üles reguleeritud just T_H2 (IL-4 ja IL-10) ja T_H3 (TGF- β) alatüübi tsütokiinid (Rabinovitch, 1998). Katz *et al.* (1995) leidsid, et kuigi T_H1 tsütokiinid soodustasid T1D teket, siis T_H2 tsütokiinid küll infiltreerusid pankrease saarekestesse, kuid ei põhjustanud ega hoidnud ka ära T1D teket.

Tran *et al.* (2012) on näidanud, et IL-5 soodustab antigeeni-spetsiifiliste CD4⁺CD25⁺ reguleerivate T-rakkude arengut, mida on varasemalt aktiveerinud IL-4 ja autoantigeenid. Trembleau *et al.* (2003) manustasid NOD hiirtele IL-12 ja avastasid, et see põhjustab T1D kiiremat kulgu nii IFN- γ defitsiitsetes kui ka IFN- γ -positiivsetes hiirtes, mis viitab sellele, et IFN- γ ei ole diabeedi patogeneesis hädavajalik.

1.5.5 T-helperite alampopulatsiooni T_H17-ga seotud tsütokiinid

T_H17 rakud on T-helperrakkude alampopulatsioon, mida iseloomustab tsütokiini IL-17 tootmine. Aktiveeritud T_H17 rakud sekreteerivad nii IL-17A, IL-17F kui ka IL-21, IL-22 ja TNF- α ning soodustavad sellega kudede põletiku teket. T_H17 rakkude tsütokiinide produktsiooni indutseerivad TGF- β koos IL-23 ja IL-6-ga (inimeses). T_H17 rakud osalevad limaskestade kaitses, kuid neid seostatakse ka autoimmuunste ja inflammatoorsete haigustega (Korn *et al.*, 2009). IL-15 on IL-2-sarnane tsütokiin, mille roll T_H17 rakkude bioloogias pole veel täpselt teada. Ühe uurimuse kohaselt reguleerib IL-15 negatiivselt IL-17A produktsiooni ja sellega ka T_H17-vahendatud põletikku (Pandiyani *et al.*, 2012).

T_H17 immuunvastus on võimendatud perifeerse vere T-rakkudes noortel T1D patsientidel, mida iseloomustab suurenenud IL-17 sekretsioon ning IL-17 ja IL-22 ekspressioon T-rakkude aktivatsiooni järgselt *in vitro* (Honkanen *et al.*, 2010). Marwaha *et al.* (2010) leidsid, et äsja diagnoositud noortel T1D patsientidel esineb kõrge hulk tsütokiini IL-17 sekreteerivaid CD4⁺ ja CD8⁺ T-rakke.

1.5.6 Adipokiinid

Rasvkude on põhiline endokriinne organ, mis sekreteerib erinevaid signaal- ja mediaatorvalke, mida kutsutakse adipokiinideks või adipotsütokiinideks ja mille kaudu

rasvkude kommunikeerib teiste organitega. Adipokiinide hulka kuuluvad muuhulgas resistiin, plasminogeeni aktivaatori inhibiitori tüüp 1 (PAI-1 - *plasminogen activator inhibitor type 1*), adiponektiin ja leptiin, kuid ka näiteks põletikutsütokiin IL-6 ja kemokiin MCP-1 (Lehr *et al.*, 2012). PAI-1 on põhiline koe-tüüpi plasminogeeni aktivaatori (PA – *plasminogen activator*) inhibiitor. PA funktsiooniks on ära hoida tromboosi teket ja sellest tulenevalt seostatakse kõrge PAI-1 tasmeid erinevate südame-veresoonkonnahaiguste tekke riski tõusuga (Vaughan, 2005).

Adipokiinid on väga tugevalt seotud kehamassiindeksi (BMI – *body mass index*) ja T2D-ga. On näidatud, et resistiin indutseerib insuliiniresistentsuse teket (Steppan *et al.*, 2001). Adipokiinide seost T1D-ga on aga vähem uuritud. Näiteks on üks uuring leidnud, et PAI-1 tasemed on T1D patsientide hulgas kõrgemad võrreldes kontrollidega (Adly *et al.*, 2014).

1.5.7 Kasvufaktorid

Granulotsüüdi-monotsüüdi kolooniat stimuleerivat faktorit (GM-CSF - *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*) toodavad immuunvastuse käigus aktiveeritud T-rakud, makrofaagid, endoteelirakud ja luuüdi enda stroomarakud. GM-CSF toime suureneb immuunrakkude produktsioon luuüdis ning see tsütokiin kiirendab luuüdirakkude diferentseerumist dentriitrakkudeks ja monotsüütideks (Uibo *et al.*, 2015). T1D korral on näidatud, et GM-CSF suurendab DC-de ja CD4+CD25+ T_{reg}-ide hulka ning hoiab sellega ära diabeedi tekke (Gauderau *et al.*, 2007).

IL-2 on antigeeni stimuleeritud T-rakkude kasvufaktor – tema toime hakkavad T-rakkude kloonid paljunema. IFN- γ on keskne makrofaage aktiveeriv tsütokiin ning tema bioloogiline funktsioon on seotud rakulise immuunsuse aktivatsiooniga vastusena rakusisestele infektsioonitekitajatele. IL-2 ja IFN- γ (kutsutakse ka immuuninterferooniks ja tüüp II interferooniks) kuuluvad ühtlasi ka Th1-rakkude alapopulatsiooni tsütokiinide hulka (Uibo *et al.*, 2015). IL-2 defitsiitsus põhjustab pankrease saarekestes T_{reg} düsfunktsiooni, mis viib järkjärgult perifeerse tolerantsi kadumiseni ja lõpuks T1D tekkeni (Tang *et al.*, 2008). INF- γ osaleb nii β -rakkude hävitamises, insuliidi arengus kui ka T1D tekkes, võimendades selleks MHC ekspressiooni ja antigeenide presentatsiooni (Herrath *et al.*, 1997).

IL-2 retseptor (IL-2R) koosneb kolmest ahelast – α , β ja γ . IL-2 aktivatsiooni järgselt hakkavad T-rakud tootma tootma alaühikut IL-2R α , mis liitub kas IL-2R β või IL-2R $\beta\gamma$ -ga (kolmikkompleks on kõige suurema afiinsusega). IL-2R α ekspressioon on heaks T-rakkude aktivatsiooni markeriks. Sekreteeritud IL-2R α on membraaniga seotud IL-2R α trunkeeritud variant, millel on ainult ekstramembraanne domeen. sIL-2R α afiinsus IL-2-te siduda on

sarnane, mis membraaniga seotud IL-2 retseptori α alaühikul. Suurenenud sIL-2R α tase võib viidata erinevatele pahaloomulistele, autoimmuunsetele või allergilistele häiretele (Caruso *et al.*, 1993).

1.6 Tsütokiinide kontsentratsioonide määramine ja probleemid

Mitmed parameetrid võivad mõjutada tsütokiinide kontsentratsioone nii *in vivo* kui ka *in vitro*. Myrianthefs *et al.* (2003) vaatlesid, kas aastaeg võiks mõjutada tsütokiinide produktsiooni tervete inimeste veres ja leidsid, et varasuvel näib domineerivat proinflammatoorsete tsütokiinide (TNF- α , IL-6) vastus, mis tasakaalustub varasügisel, kui üles on reguleeritud põletikuvastased tsütokiinid (IL-10, TNF-RI, TNF-RII). Killestein *et al.* (2002) aga avastasid, et polüskleroosi (autoimmuunhaigus) patsientidel on TNF- α ja IFN- γ tasemed kõige kõrgemad just sügisel.

Vereproovide ebaõiged käitlemise ja/või säilitamistingimused võivad tugevalt mõjutada biomarkerite tasemeid, mistõttu võib see tekitada probleeme nii biomarkerite määramisel kui ka nende tulemuste interpreteerimisel. Jager *et al.* näitasid, et pikaajalise säilitamise tulemusena vähenesid mitmete tsütokiinide (IL-1 β , IL-10, IL-15, IL-8) tasemed nende algkontsentratsioonist kuni 75%. Samuti mõjutas tsütokiinide stabiilsust mitmekordne vereproovide sulatamine-külmutamine (de Jager *et al.*, 2009). Tsütokiinide määramisel *in vitro* võivad tulemusi oluliselt mõjutada ka vereproovi tüüp (seerum või plasma) ja plasmas kasutatav antikoagulant (Zhou *et al.*, 2010).

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Uurimistöö eesmärgid

Käesoleva magistritöö hüpoteesiks oli, et teatud fenotüüpilised tunnused T1D haigetel on seotud erinevustega vereplasma tsütokiinide profiilis.

Hüpoteeside lahendamiseks seati järgnevad ülesanded:

1. Võrrelda vereplasma tsütokiinide kontsentratsioonide erinevusi äsja T1D diagnoositud noortel patsientidel ja ealiselt ning sooliselt sobitatud võrdlusgrupi vahel.
2. Selgitada, millised vereplasma tsütokiinide nihked kaasuvad diabeetiliste ainevahetushäiretega.
3. Leida seoseid diabeedile iseloomulike autoantikehade esinemise ja vereplasma tsütokiinide profiili vahel.
4. Võrrelda erinevate HLA riskirühmade tsütokiinide profiile T1D haigetel ja võrdlusgrupis.
5. Selgitada, kas verevõtu aastaaeg mõjutab tsütokiinide profiili.

2.2 Materjal ja meetodika

2.2.1 Valimi kirjeldus ja uuringumaterjal

Uuritavate hulka kuulusid 53 äsja diagnoositud noort T1D patsienti (keskmine vanus $10,1 \pm 3,2$ aastat; 25 poissi/28 tüdrukut). Võrdlusgruppi kuulus 60 isikut (keskmine vanus $12,15 \pm 5,6$ aastat; 24 poissi/36 tüdrukut) (tabel 4). T1D patsiendid värvati uuringusse SA Tartu Ülikooli Kliinikumi Lastekliinikust ja SA Tallinna Lastehaiglast aastatel 2008-2015. T1D diagnostilised kriteeriumid põhinesid rahvusvahelisel diabeedi klassifikatsioonil (ADA, 2003). Saadaval oli info kaasnevate autoimmuunhaiguste kohta nagu autoimmuunne türeoidiit, Graves'i tõbi, Addisoni tõbi, tsöliaakia, vitiligo, autoimmuunsed maksa- ja reumaatilised haigused ja polüskleroos. T1D patsientidel valdavalt teisi autoimmuunhaigusi ei tuvastatud, v.a kuus patsienti, kellel oli varasemalt diagnoositud kilpnäärme haigus (autoimmuunne türeoidiit või Graves'i tõbi). Viiel T1D haigel lisaks oli kõrge anti-TPO tase, kuigi neil kilpnäärme haigusi polnud diagnoositud.

Võrdlusgrupp koosnes noortest tervetest vabatahtlikest ($n = 17$) ja Tartu Ülikooli Kliinikumi lastekirurgia patsientidest ($n = 43$; vt diagnoosid tabel 4). Võrdlusgruppi kuulusid isikud, kellel ei olnud diagnoositud mitte ühtegi ainevahetusega autoimmuunhaigust (sealhulgas ka mitte

ühtegi diabeedivormi). Ühel võrdlusgrupi isikul tuvastati veres IA-2 AAK-d ja teisel anti-TPO. Võrdlusgrupi indiviidide paastuglukoosi tasemed olid normväärtustega.

Uuritavate tühja kõhu venoosne veri võeti EDTA-katsutitesse (BD Vaccuteiner, Suurbritannia). Katsuteid tsentrifuugiti (mitte rohkem kui neli tundi pärast verevõtmist) toatemperatuuril 2000 rpm juures 15 minutit (Centrifuge 5424R, Eppendorf AG, Saksamaa). Vereplasma erldati rakkude massist ja säilitati -80° C juures. Tsütokiinide määramiseks valiti vaid need proovid, mis olid ülessulatatud mitte rohkem kui kaks korda (vastavalt testsüsteemide tootja soovitusetele).

T1D patsientide perifeerne veri võeti vahetult pärast T1D diagnoosimist (1-10 päeva vahemikus) ja enamus patsientidest olid vere võtmise ajal insuliiniravil. AAK ja kliinilised vereuuringud tehti SA TÜ Kliinikumi Ühendlaboris. Kokkuvõtte uuritavate tunnustest võib leida tabelist 3.

Tabel 3. Uuritavate kirjeldus.

Tunnus	T1D (n= 53)	Võrdlusgrupp (n= 60)	Kogu grupp (n= 113)
Vanus verevõtul (aastates)	10,1 ±3,2	12,2 ±5,6	11,2 (4,7)
Sugu			
mees	25 (47,2%)	24 (40%)	49 (43,4%)
naine	28 (52,8%)	36 (60%)	64 (56,6%)
Insuliiniravi			
jah	51 (96,2%)	0 (0%)	51
ei	2 (3,8)	60 (100%)	62
Diabeetilised ainevahetushäired			
ketoatsidoos koos ketonuuriaga (3)	23 (43,4%)	0 (0%)	23 (20,4%)
ainult ketonuuria (2)	17 (32,1%)	0 (0%)	17 (15%)
ainevahetushäireta (1)	13 (24,5%)	60 (100%)	73 (64,6%)
Autoantikehad (+)			
GADA (≥ 5 U/ml)	47 (88,7%)	0 (0%)	47 (41,6%)
IA-2A ($\geq 7,5$ U/ml)	38 (71,7%)	1 (1,7%)	39 (34,5%)
anti-ZnT8 (≥ 15 U/ml)	43 (81,1%)	0 (0%)	43 (38,1%)
anti-TPO ¹ (> 100 U/ml)	5 (9,4%)	1 (1,7%)	6 (5,3%)
Diabeediga seotud erinevate autoantikehade arv			

3	30 (56,6%)	0 (0%)	30 (26,5%)
2	16 (30,2%)	0 (0%)	16 (14,1%)
1	6 (11,3%)	1 (1,7%)	7 (6,2%)
0	1 (1,9%)	59 (98,3%)	60 (53,2%)
Verevõtu aastaeg			
talv	9 (17%)	18 (30%)	27 (23,9%)
kevad	14 (26,4%)	12 (20%)	26 (23%)
suvi	12 (22,6%)	2 (3,3%)	14 (12,4%)
sügis	18 (34%)	28 (46,7%)	46 (40,7%)
HLA riskigrupid²			
(0) tugev kaitse	3 (5,7%)	24 (40%)	27 (23,9%)
(1) mõõdukas kaitse	3 (5,7%)	11 (18,3%)	14 (12,4%)
(2) neutraalne	11 (20,7%)	15 (25%)	26 (23%)
(3) vähene risk	13 (24,5%)	6 (10%)	19 (16,8%)
(4) mõõdukas risk	10 (18,9%)	3 (5%)	13 (11,5%)
(5) kõrge risk	13 (24,5%)	1 (1,7%)	14 (12,4%)
C-peptiid (nmol/L)³			
normväärtusega (0,37-1,47)	7 (13,2%)	-	-
alla referents- väärtuse (< 0,37)	31 (58,5%)	-	-

Rõhutatud kirjas on märgitud statistiliselt olulise ($p < 0,05$) erinevusega grupid. Parameetrilised tunnused analüüsiti t-testiga, mitte-parameetrilised Wilcoxon testiga. 1 – kolmel võrdlusgrupi indiviidil anti-TPO-sid ei määratud; 2 – HLA grupeerimist vt **tabelist 5** ja **6** (alateema 2.2.4); 3 – C-peptiidi ei määratud 15 indiviidil T1D grupis.

Uuringu kiitis heaks Tartu Ülikooli inimuuringute eetika komitee (protokollid 163/T-6, 24.09.2007 ja 179/M-29, 16.02.2009). Kõik patsiendid, nende vanemad ja/või nende hooldajad andsid kirjaliku nõusoleku uuringus osalemiseks.

Tabel 4. Nimekiri kirurgilistest probleemidest, millega võrdlusgrupi lapsed haiglasse pöördusid.

Võrdlusgrupi isikute diagnoosid	
Dgn kood	Haiguse nimetus¹
D18.0	kõigi paikmete hemangioom
I78.1	mitte-neoplastiline neevus

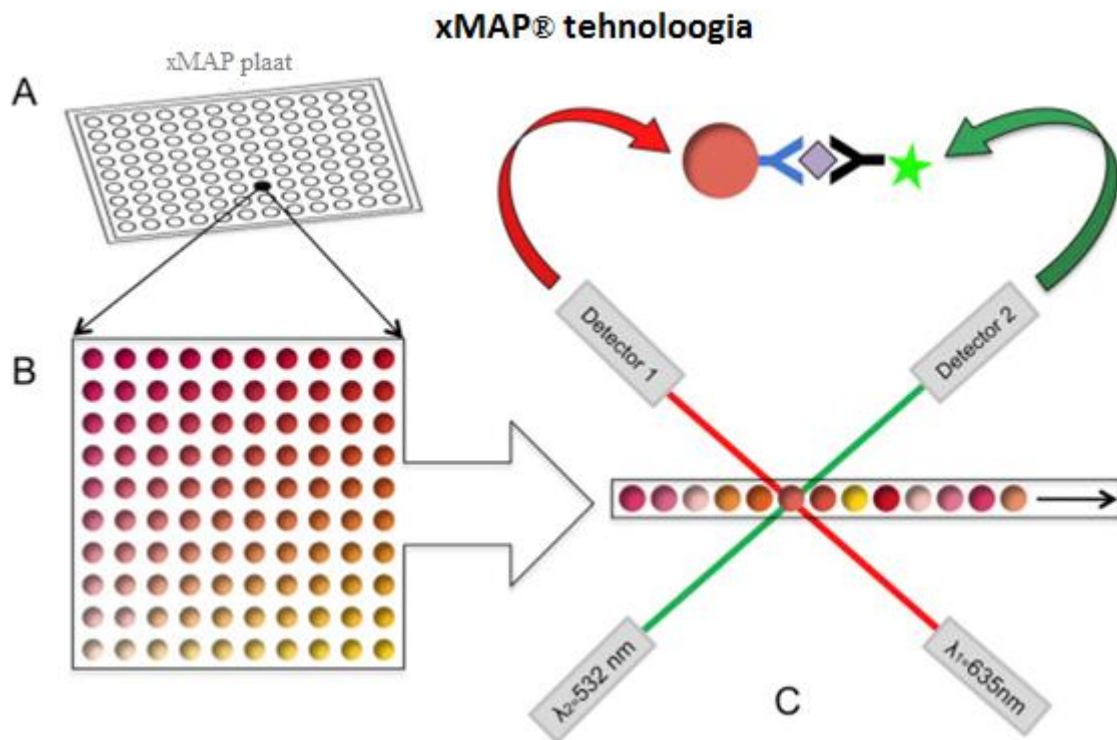
K40.9	kubemesong
K80.1	sapikivi ja sapipõiepõletik
L91.0	keloidarm
N42.3	bilateraalne eesnäärme düsplaasia
N43.0	tsüstitekkeline vesisong
N43.2	muu vesisong
Q55.2	munandi ja munandikoti muu kaasasündinud väärareng
Q74.3	jäsemete kaasasündinud krampkõnksumus
Q82.5	kaasasündinud mitte-kasvajaline neevus
Z00.1	lapse tervise tavaläbivaatus/väikelapse arengu testimine
T92.2	randme- ja käepiirkonna murru jääknähud

¹Info pärit: <https://www.med24.ee/andmebaasid/rhk10>

2.2.2 Tsütokiinide määramine (xMAP® tehnoloogia)

Määrati 33 tsütokiini xMAP® tehnoloogia abil (Luminex Corporation, Austin TX, USA). Tsütokiinide määramine jaotus Millipore'i poolt toodetud seitsmesse Milliplex®MAP testsüsteemi (Millipore, Billerica MA, USA), milleks olid TGF-β 1, 2, 3 Magnetic Bead Kit (tsütokiinid TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3), Human Adipokine Magnetic Bead Panel 1 (adiponektiin, resistiin, PAI-1), Human Adipokine Magnetic Bead Panel 2 (leptiin), Human Soluble Cytokine Receptor Magnetic Bead Panel (sIL-1RI, sIL-2Rα, sTNF-RII), Human Chemokine/Cytokine Magnetic Bead Panel (IP-10, MCP-1, MIP-1β), Human High Sensitivity T Cell Magnetic Bead Panel (GM-CSF, IFN-γ, IL-10, IL-12, IL-13, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-17A, IL-23, TNF-α), Human Th17 Magnetic Bead Panel (IL-17F, IL-22, IL-27, IL-15).

Luminex xMAP® tehnoloogia põhiolemus (**joonis 2**) baseerub AK-dega kaetud mikrokerakestel, mis on märgistatud fluorovärvi erinevate toonidega, ja mis püüavad lahusest kinni vastava analüüdi (siinkohal tsütokiini). Järgnevalt seondub analüüdile biotiiniga märgistatud sekundaarne AK, millega omakorda liitub streptavidiin-fükoerütriin (PE – fükoerütriin) konjugaat. Seejärel mikrokerakesed liiguvad ükshaaval läbi laserite voo, millest üks ergastab mikrokerakese sisemised värvid ja teine laser reportertermolekuli (PE) fluorestseeruva värvi. Luminexi masin tuvastab iga üksiku mikrokerakese ja mõõdab vastavad fluorestsentsi väärtused (MFI – *median fluorescent intensity*), võimaldades korraga ühes reaktsioonis määrata kuni 100 erinevat biomarkerit.



Joonis 2. Luminex xMAP® tehnoloogia põhiolemus (Scarano *et al.*, 2016).

Protokoll liühikokkuvõte: Ettevalmistavas etapis sulatati plasmaproovid täielikult jäävabaks ja segati. Adipokin 1, TGF- β ja Soluble Cytokine Receptor testkomplektide tsütokiinide määramiseks lahjendati plasmad enne reaktsiooni lisamist vastavalt 400-, 30- ja 5-kordselt. Samuti valmistati ette kontrollproovid (QC – *quality control probes*), standardid ja sonikeeriti magnetilised kerakesed. Kõik kasutatud reagentid soojendati eelnevalt toatemperatuurini. TGF- β määramiseks töödeldi plasmad soolhappega, et tsütokiin muutuks aktiivseks.

Tsütokiinide kontsentratsioonide määramisel kasutati 96-augulist mikrotiiterplaati, millest 76 auku olid mõeldud proovide jaoks ja ülejäänud sisaldasid QC kontrollid (2, kahes korduses), standardeid (kuus või seitse; kahes korduses). Kogu protsess jaotus kahele päevale. Esimesel päeval segati kokku plasmaproovid ja primaarse AK-ga kaetud mikrokerakesed, mis jäeti 18-tunniks toatemperatuurile loksutil inkubeerima.

Järgmisel päeval (18 tunni möödudes) pesti mikrokerakesi kaks või kolm korda (olenevalt testsüsteemist) pesupuhvriga. Pesemise juures kasutati magnetplaati, mis kindlustas selle, et mikrokerakesed plaadi põhjale kinnituksid ja pesemise käigus ära ei kaoks. Pesemise järgselt lisati aukudesse 25 või 50 μl (olenevalt testsüsteemist) detektsiooni-antikehi ja loksutati tiiterplaati toatemperatuuril 1 tund. Edasi lisati reaktsioonisegusse 25 μl streptavidiin-PE

konjugaati ja lasti plaadil seista toatemperatuuril 30 minutit. Seejärel toimus taas mikrokerakeste pesu. Mikrokerakeste analüüsiks suspendeeriti need 100 või 150 µl Luminexi voolutuspuhvril. Plaat sisestati Luminex 200™ masinasse (Luminex Corporation, Austin TX, USA), mis mõõtis proovide MFI-id. Tsütokiinide kontsentratsioonid arvutati standardkõvera järgi, kasutades xPONENT 3.1 programmi (Luminex) ja 5-parametrilist logilistilist võrrandit [valem 1].

$$x = c((b - a/y - a)^{1/f})^{1/d} \quad [\text{valem 1}]$$

a – minimaalne asümptoot; b – maksimaalne asümptoot; c – käänupunkt (*inflection point*); d – Hill'i koefitsent (*Hill's slope*); f – asümmeetria koefitsent (*asymmetry factor*); x – kontsentratsioon; y - MFI

Edasisest analüüsisist jäeti välja tsütokiinid, mille väärtustst >30% olid väljaspool määramispiiri tulemusi või kordusmääramiste variatsioonikoefitsent (CV% - *coefficient of variation*) ületas 15%. Neid kriteeriume arvestades jäid lõplikku analüüsi järgmised 23 tsütokiini: resistiin, PAI-1, IP-10, MCP-1, MIP-1β, GM-CSF, IFN-γ, IL-10, IL-12, IL-13, IL-1β, IL-17A, IL-23, IL-5, IL-6, IL-8, TNF-α, TGF-β1, TGF-β2, sIL-2Rα, sTNF-RII, IL-17F ja IL-15. Kuna erinevad testkomplektid võimaldasid määrata erineva arvu proove, siis tsütokiinide resistiin, PA-1, IP-10, MIP-1β, GM-CSF, IL-13, sIL-2Rα, TGF-β1, TGF-β2 ja IL-17F lõplikku valimisse jäi 79 uuritavat (võrdlusgrupis 32, T1D grupis 47), kõigi teiste tsütokiinide puhul oli valimi suuruseks aga 113 (võrdlusgrupis 60, T1D grupis 53).

2.2.3 HLA genotüpiseerimine

HLA genotüpeerimine tehti Soomes professor Jorma Iloneni poolt juhitud immunogeneetika laboris (*Institute of Biomedicine, Department of Medical Microbiology and Immunology, Immunogenetics Laboratory University of Turku*). Individuaalsete haplotüüpide ning nendel põhinevate genotüüpide jaotuvust, kodeerimist ja nende šansside suhet (OR – *odds ratio*) võib näha tabelistes 5 ja 6.

Tabel 5. Individuaalsed haplotüübid (Ilonenen *et al.*, 2016).

Haplotüüp	OR _{T1D}	CI95	Riskigrupp
DRB1*04:01-DQA1*03-DQB1*03:02	10,11	8,86-11,54	S
DRB1*04:05-DQA1*03-DQB1*03:02	3,01	1,07-8,45	S
DRB1*04:04-DQA1*03-DQB1*03:02	2,82	2,40-3,32	s
(DR3)-DQA1*05-DQB1*02	2,81	2,50-3,17	s
DRB1*04:02-DQA1*03-DQB1*03:02	1,75	0,57-5,36	S
(DR13)-DQB1*06:04	1,13	0,93-1,37	N
(DR9)-DQA1*03-DQB1*03:03	0,97	0,80-1,17	N
(DR8)-DQB1*04	0,95	0,83-1,08	N
(DR16)-DQB1*05:02	0,79	0,52-1,21	N
(DR7)-DQA1*0201-DQB1*02	0,63	0,52-0,77	N
(DR1/10)-DQB1*05:01	0,58	0,52-0,65	N
(DR4)-DQA1*03-DQB1*03:01	0,51	0,40-0,66	N
DRB1*0403-DQA1*03-DQB1*03:02	0,37	0,20-0,66	p
(DR13)-DQB1*06:09	0,36	0,14-0,92	N
(DR13)-DQB1*06:03	0,23	0,19-0,28	p
(DR11/12/13)-DQA1*05-DQB1*0:301	0,23	0,19-0,28	p
(DR7)-DQA1*02:01-DQB1*03:03	0,08	0,05-0,16	P
(DR15)-DQB1*06:01	0,07	0,01-0,53	P
(DR15)-DQB1*06:02	0,03	0,03-0,05	P
(DR14)-DQB1*05:03	0,03	0,01-0,08	P

*S – tugev risk; s – madal risk; N - neutraalne; p – nõrk kaitse ; P – tugev kaitse.

Tabel 6. Genotüübi riskigrupid, mis põhinevad individuaalsetel haplotüüpidel (Ilonenen *et al.*, 2016).

Genotüübi riskigrupp	Numbriline kood	Haplotüübi kood
tugev risk	5	S/s, s/s (kui DR3-DQ2/DR4-DQ8)
mõõdukas risk	4	S/s, s/s (v.a need, mis on grupis 5), S/S, S/N
vähene risk	3	s/N, S/p
neutraalne	2	N/N, S/P, s/P, s/p
mõõdukas kaitse	1	p/N
tugev kaitse	0	P/N, p/p, P/p, P/P

*S – tugev risk; s – madal risk; N - neutraalne; p – nõrk kaitse ; P – tugev kaitse.

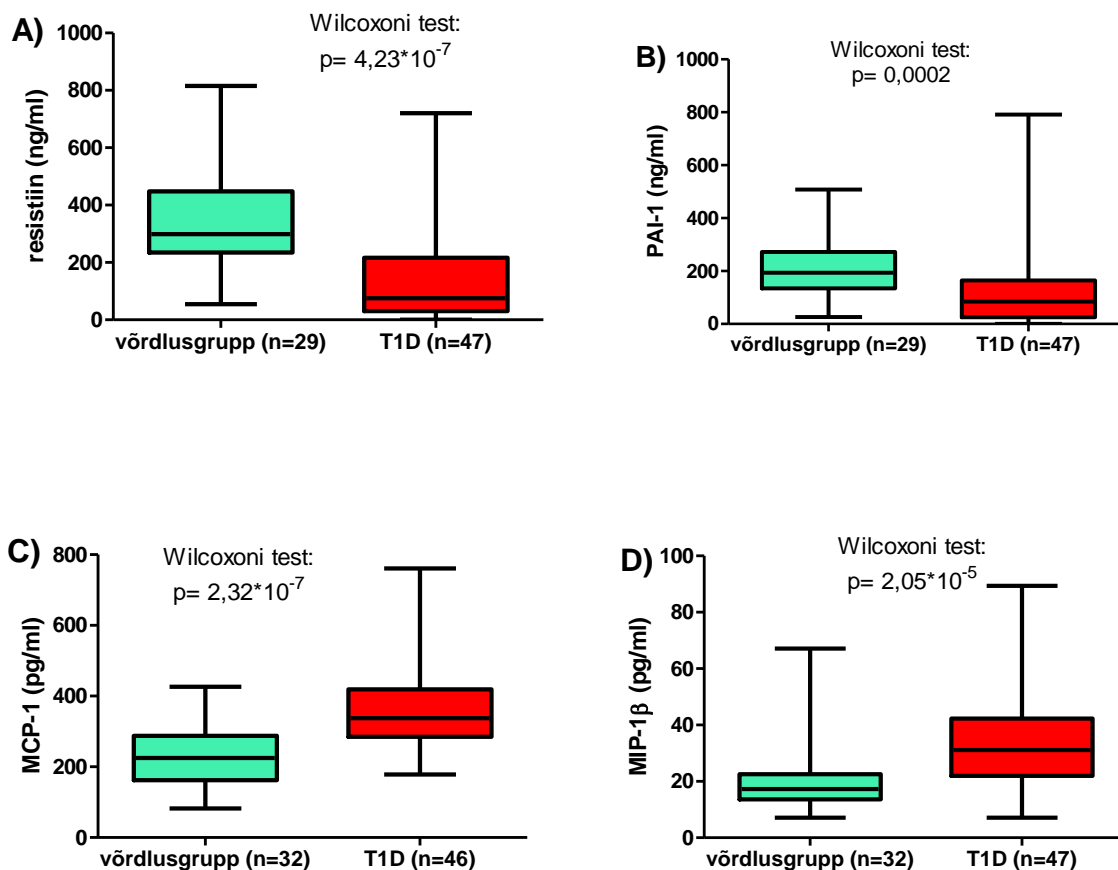
2.2.4 Statistiline analüüs

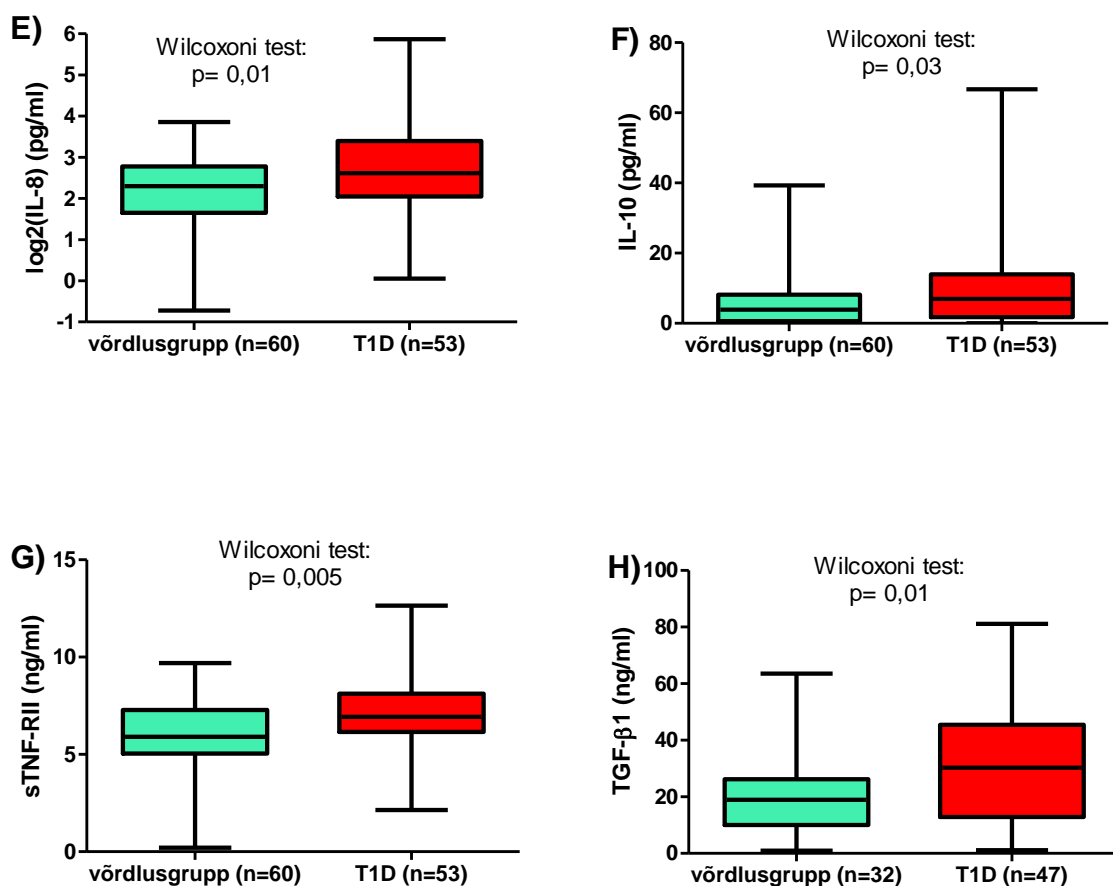
Statistiline analüüs viidi läbi, kasutades statistikaprogrammi R© (versioon 3.3.3, Free Software Foundation, Boston, USA). Enamike tsütokiinide kontsentratsioonidel ei olnud normaaljaotuvust, mistõttu nende analüüsil kasutati mitte-parameetrilisi teste (Wilcoxon test, Kruskal-Wallise test, Spearmani korrelatsiooni test). Normaaljaotuvusega fenotüübiliste tunnuste (näiteks vanus) analüüsiks kasutati parameetrilist t-testi. Mudelite analüüs on tehtud lineaarse regressiooniga ja kohandatud soole, vanusele, verevõtu aastaajale ja HLA riskigruppidele. Oluliseks p-väärtuseks loeti neid, mis olid $< 0,05$. Kõik joonised on tehtud graafika tarkvaraga Graphpad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

2.3 Tulemused

2.3.1 Tsütokiinide kontsentratsioonide seos diagnoosiga

Tabelist 7 (lisa 1) võib näha, et võrdlusgrupi ja äsja diagnoositud T1D grupi vahel erinesid mitmete tsütokiinide kontsentratsioonid. Adipokiinide (resistiin, PAI-1) tasemed olid T1D grupis oluliselt madalamad. Kemokiinide (MIP-1 β , MCP-1, IL-8), kuid mitte IP-10, tasemed olid vastupidiiselt jällegi T1D grupis kõrgemad. Klassikaliste põletikutsütokiinide (IL-1 β , IL-6, TNF- α) kontsentratsioonide erinevused gruppide vahel välja ei tulnud. Vastupidi, T1D grupis olid kõrgemad põletikuvastaste tsütokiinide (IL-10, TGF- β 1) ning TNF- α retseptori sTNF-RII kontsentratsioonid. Tsütokiinide erinevusi illustreerivad karp-vurrud diagrammid **joonistel 5A-5H**.





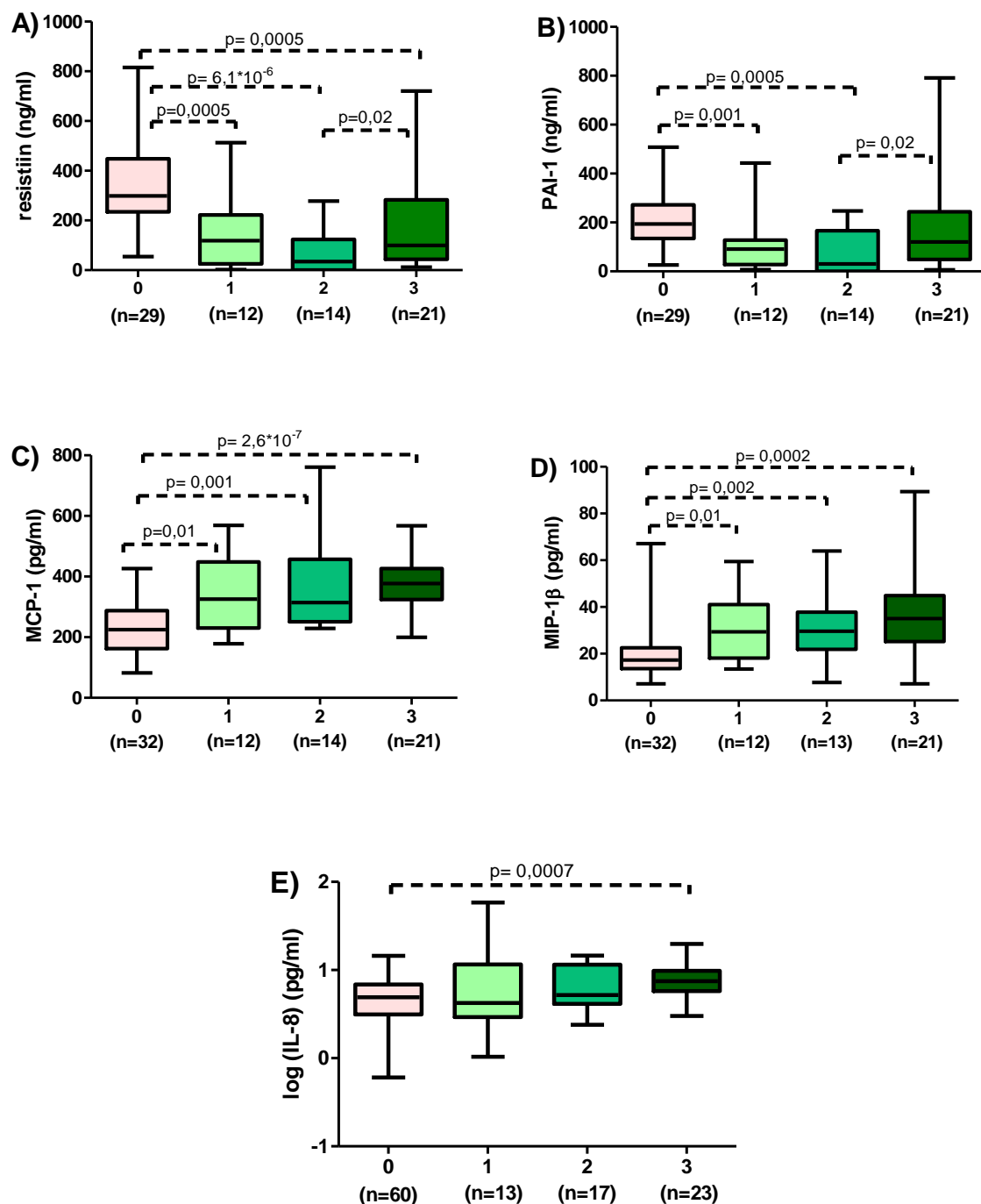
Joonis 5. Karp-vurrud diagrammid võrdlusgrupi ja T1D tsütokiinide tasemest. A) Resistiin; B) PAI-1; C) MCP-1; D) MIP-1β; E) IL-8 (logaritmitud); F) IL-10; G) sTNF-RII; H) TGF-β1. Joonisel on näha minimaalse-maksimaalse pikkusega „vurrud“ ja „karp“, mille sees paikneb 50% tulemustest (piirneb 25% ja 75% kvartiiliga).

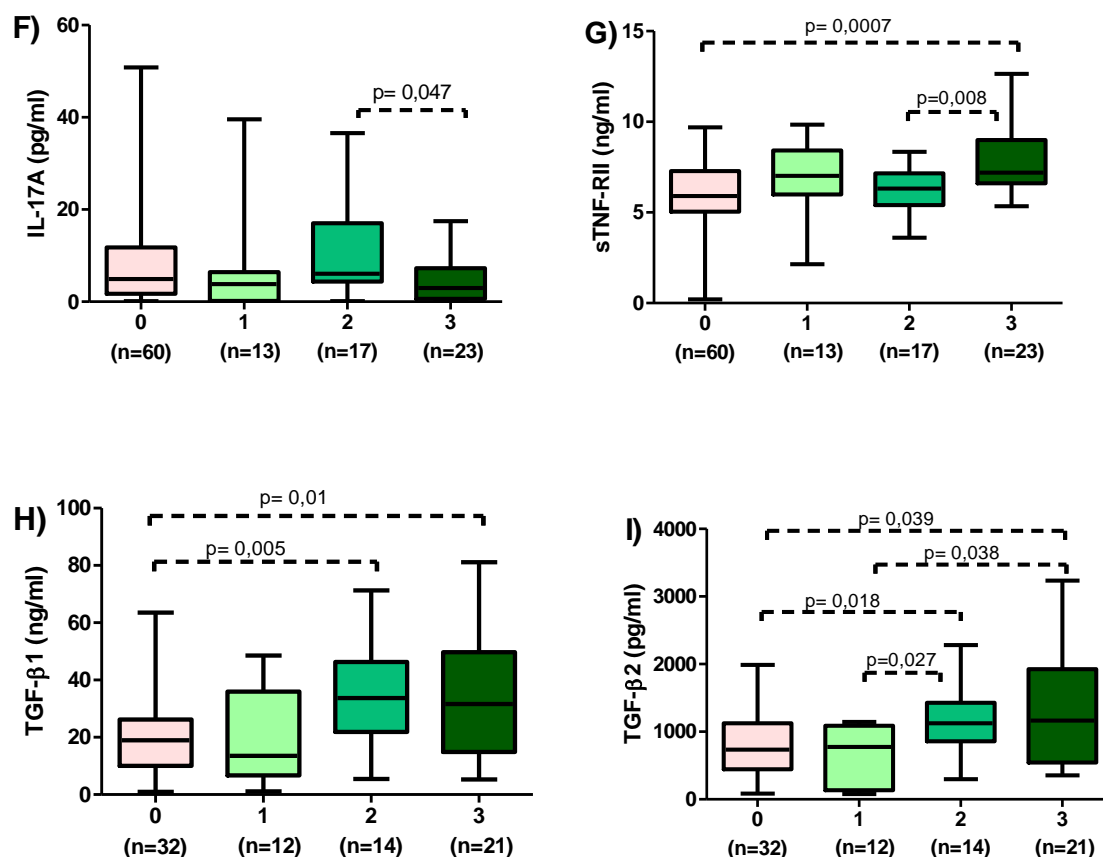
2.3.2 Tsütokiinide kontsentratsioonide seos diabeetiliste ainevahetushäiretega

Tsütokiinide kontsentratsioonide erinevusi diabeetiliste ainevahetushäirete korral analüüsiti kõigepealt ainult T1D grupis ja hiljem analüüsiti ka T1D gruppi koos võrdlusgrupiga (**lisa 1: tabel 8**). T1D grupp jaotus kolmeks – ainevahetushäireta patsiendid (grupp 1), patsiendid, kellel oli ainult ketonuuria (grupp 2) ja patsiendid, kellel oli ketoatsidoos koos ketonuuriaga (grupp 3).

Selgus, et ka T1D alagrupid erinevad võrdlusgrupist mitmete samade tsütokiinide poolest, mille kontsentratsioonid samuti diagnoosist sõltuvalt erinevad tulid (resistiin, MCP-1, MIP-1β). IL-10 tasemed ei erinenud ühegi T1D alagrupi ja võrdlusgrupi vahel, kuigi võrdlusgrupi ja haigete vahel leidsime varasemas analüüsis erinevuse (vt **joonis 5F**). TGF-β2 oli ainuke tsütokiin, mille tasemed erinesid ainevahetushäireta (grupp 1) ja ainevahetushäirega (grupid 2 ja 3) vahel – mõlemal juhul olid ainevahetushäire korral TGF-β2 kontsentratsioonid kõrgemad võrreldes ainevahetushäireta T1D grupiga.

Huvitaval kombel erinesid tsütokiinide kontsentratsioonid ka kahe alagrupi vahel, kellel esines erineva raskusastmega ainevahetushäire. Nimelt võis märgata, et resistiini, PAI-1 ja sTNF-RII kontsentratsioonid olid ainult ketonuuria grupis madalamad ja IL-17A kontsentratsioon oli kõrgem võrreldes patisientidega, kellel oli nii ketonuuria kui ka ketoatsidoos (joonised 6A-6I).



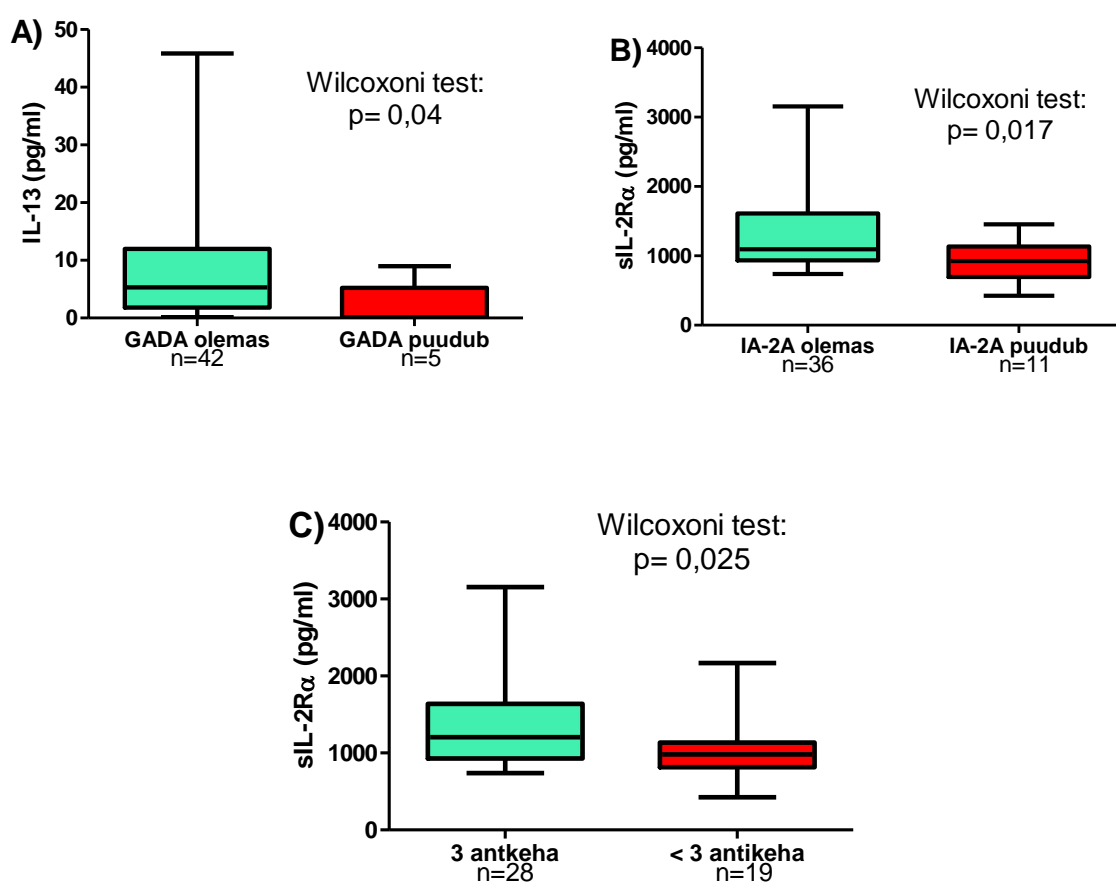


Joonis 6. Tsütokiinide seos ainevahetushäiretega. 0 – võrdlusgrupp, 1 – ainevahetushäireta T1D, 2 – ainult ketonuuria, 3 – ketoatsidoos koos ketonuuriaga. A) Resistiin; B) PAI-1; C) MCP-1; D) MIP-1β; E) IL-8 (logaritmitud); F) IL-17A; G) sTNF-RII; H) TGF-β1; I) TGF-β2. Joonisel on näha minimaalse-maksimaalse pikkusega „vurrud“ ja „karp“, mille sees paikneb 50% tulemustest (piirneb 25% ja 75% kvartiiliga).

2.3.3 Tsütokiinide kontsentratsioonide seos diabeediga seotud autoantikehadega

Tsütokiinide olulisi erinevusi, mis seostusid diabeedi AAK tüübi ja erinevat tüüpi AAK arvuga, oli vähe. Neil T1D patsientidel, kellel leidsid GADA ja neil, kellel vastavad AAK-d puudusid, erinesid oluliselt vaid IL-13 tsütokiini kontsentratsiooni poolest (**joonis 9A**). GADA+ T1D patsientidel oli kõrgem IL-13 kontsentratsioon (mediaanid: 5,33 vs 0,16 pg/ml; p-väärtus=0,04, Wilcoxon test). Samuti leiti, et IA-2A positiivsetel ja IA-2A negatiivsetel T1D patsientidel erinevad sekretoorse IL-2Rα kontsentratsioonid (**joonis 9B**). Võrreldes anti-ZnT8 positiivsete ja negatiivsete patsientide tsütokiinide kontsentratsioone, siis olid kõik p-väärtused ebaolulised ($p > 0,05$).

Lisaks vaadeldi tsütokiinide kontsentratsioonide erinevusi sõltuvalt sellest, mitme erineva tüüpi AAK-de suhtes haiged positiivsed olid. Kuna T1D patsientide hulk, kellel ei olnud või tuvastati 1 või 2 erinevat AAK-d oli piisavalt väike (gruppide suurused vastavalt 1, 6 ja 16 isikut), otsustasin analüüsis võrrelda neid T1D patsiente kellel leidis kolm erinevat autoantikehi ja neid, kellel leidis < 3 erinevat AAK. Eelnevalt mainitud gruppidel erinesid sIL-2R α kontsentratsioonid – 3 antikehaga T1D patsientidel olid nimetatud retseptori kontsentratsioonid kõrgemad (mediaan: 1205 pg/ml) võrreldes T1D patsientidega, kellel tuvastati vähem kui kolm erinevat AAK (mediaan: 981 pg/ml; $p = 0,025$, Wilcoxon test). Gruppide erinevus on vaadeldav **jooniselt 9C**.



Joonis 9. Antikehade erinevus T1D patsientide hulgas sõltuvalt autoantikeha tüübist ja hulgast. A) GADA; B) IA-2A; C) 3 AAK vs < 3 AAK. Joonisel on näha minimaalse-maksimaalse pikkusega „vurrud“ ja „karp“, mille sees paikneb 50% tulemustest (piirneb 25% ja 75% kvartiiliga).

2.3.4 Tsütokiinide kontsentratsioonide seos HLA haplotüüpidega

Analüüsiti tsütokiinide kontsentratsioonide erinevusi seoses T1D HLA riskigruppidega, mis jagunesid viieks – tugev kaitse (0), mõõdukas kaitse (1), neutraalne (2), vähene risk (3), mõõdukas risk (4) ja tugev risk (5) (tabel 7). T1D grupis kuulus alagruppidesse 0 ja 1 liiga vähe uuritavad ($n < 5$), mistõttu otsustati need alagrupid analüüsil üheks kaitsva HLA grupiks kokku võtta (**tabel 9**). Võrdlusgrupis oli vastupidiselt alagruppides 3, 4 ja 5 liiga vähe uuritavaid, mistõttu otsustati need alagrupid analüüsil üheks riski HLA alagrupiks kokku võtta (**tabel 10**).

T1D grupis ühtegi olulist erinevust ei esinenud. Võrdlusgrupis erinesid PAI-1 tasemed kolmik-riskigrupi ja kõigi teiste gruppide vahel – tugeva kaitse, mõõduka kaitse ja neutraalses grupis olid PAI-1 kontsentratsioonid madalamad võrreldes grupiga, mis hõlmas endas vähese, mõõduka ja tugeva riski gruppe. IL-8 tasemed erinesid tugeva kaitse grupi ja mõõduka kaitse grupi või neutraalse grupi vahel (viimased madalamad võrreldes 0-grupiga). sTNF-RII tasemed erinesid mõõduka kaitse ja tugeva kaitse või neutraalse grupi vahel – sTNF-RII tasemed olid tugeva kaitse ja neutraalses grupis madalamad võrreldes mõõduka kaitse grupiga.

Tabel 9. HLA riskigruppide seos tsütokiinide kontsentratsioonidega T1D patsientide hulgas.

HLA riskigrupp Tsütokiin	T1D					p-väärtus ^a
	(0) tugev + (1) mõõdukas kaitse	(2) neutraalne	(3) vähene risk	(4) mõõdukas risk	(5) tugev risk	
Resistiin (ng/ml)	45,8 (36,5-117)	45,8 (36,7-128)	100 (62,2-243)	27,8 (5,80-83,8)	175 (68,0-233)	0,127
PAI-1 (ng/ml)	79,2 (45,1-115)	48,7 (38,2-145)	120 (63,6)	223 (2,91-118)	108 (55,0-211)	0,421
IP-10 (pg/ml)	185 (179-200)	218 (187-238)	370 (241-512)	299 (252-459)	325 (237-566)	0,106
MCP-1 (pg/ml)	340 (325-392)	359 (331-429)	326 (258-392)	294 (233-375)	349 (277-463)	0,769
MIP-1β (pg/ml)	32,6 (25,1-40,1)	31,4 (27,4-34,0)	42,0 (31,9-53,6)	28,9 (20,6-40,0)	27,0 (17,1-33,3)	0,194
GM-CSF (pg/ml)	60,7 (49,5-93,7)	58,5 (29,7-125)	125 (36,5-203)	94,5 (57,7-144)	82,0 (60,1-130)	0,682
IFN-γ (pg/ml)	12,0 (10,7-14,5)	7,75 (2,01-13,6)	14,8 (12,6-18,8)	12,6 (6,30-16,1)	9,72 (5,98-11,4)	0,259
IL-10 (pg/ml)	11,5 (5,03-14,2)	2,67 (0,28-8,21)	12,0 (3,11-21,1)	8,02 (4,74-11,5)	4,21 (2,25-12,4)	0,350
IL-12 (pg/ml)	2,15 (0,92-2,75)	0,65 (0,14-2,86)	2,19 (0,86-5,37)	2,67 (1,18-5,50)	2,05 (1,02-3,82)	0,511
IL-13 (pg/ml)	6,98 (3,74-10,6)	1,68 (0,14-2,68)	10,5 (6,52-18,1)	6,50 (2,10-13,6)	3,86 (0,96-6,87)	0,071
IL-17A (pg/ml)	3,41 (1,84-3,96)	4,16 (0,43-6,02)	6,79 (2,58-10,1)	5,17 (3,73-11,4)	3,81 (1,30-8,25)	0,694
IL-1β	1,02	0,44	0,50	0,85	0,74	0,518

(pg/ml)	(0,30-2,63)	(0,06-0,75)	(0,36-1,27)	(0,63-1,24)	(0,20-1,10)	
IL-23	23,8	20,7	72,9	85,5	79,0	0,465
(pg/ml)	(14,6-43,7)	(1,61-71,1)	(25,9-161)	(21,3-188)	(22,1-159)	
IL-5	3,81	2,50	4,16	3,65	4,06	0,363
(pg/ml)	(2,09-5,28)	(1,73-3,17)	(2,97-5,40)	(3,26-5,82)	(1,18-5,18)	
IL-6	0,99	0,63	1,18	0,86	1,25	0,781
(pg/ml)	(0,38-6,62)	(0,34-1,40)	(0,58-2,62)	(0,51-1,39)	(0,50-1,51)	
IL-8	7,35	4,80	7,75	4,95	5,60	0,562
(pg/ml)	(4,72-13,7)	(3,74-7,27)	(5,78-13,1)	(3,97-8,08)	(4,32-11,4)	
TNF-α	1,28	4,08	5,00	2,92	3,95	0,853
(pg/ml)	(1,20-4,47)	(2,13-5,40)	(1,71-6,41)	(2,21-4,33)	(1,39-5,61)	
sIL-2Rα	1231	927	994	1013	1182	0,190
(pg/ml)	(1006-1391)	(919-1036)	(812-1365)	(829-1458)	(1064-1697)	
sTNF-RII	6,32	6,28	7,32	7,15	6,96	0,214
(ng/ml)	(5,58-6,88)	(5,90-6,90)	(6,68-8,97)	(5,60-8,49)	(6,72-7,61)	
TGF-β1	36,3	35,2	17,0	30,9	24,9	0,926
(ng/ml)	(9,04-46,1)	(25,0-41,8)	(9,44-48,1)	(26,3-33,6)	(12,0-55,3)	
TGF-β2	994	1435	756	1088	1213	0,427
(pg/ml)	(294-1078)	(587-2132)	(447-1498)	(1022-1154)	(586-1842)	
IL-17F	0,18	0,09	0,05	0,10	0,09	0,866
(ng/ml)	(0,05-0,35)	(0,07-0,10)	(0,03-0,20)	(0,03-0,13)	(0,06-0,11)	
IL-15	93,3	57,0	25,7	53,8	54,6	0,051
(pg/ml)	(39,6-126)	(36,1-67,1)	(8,81-30,26)	(11,6-77,2)	(29,9-63,2)	

□ – Kruskal-Wallise testi p-väärtus. Tabelis on märgitud mediaanid ning sulgudes esimene ja kolmas kvartiil (IQ1-IQ3). Paaride vahelisi erinevusi on võrreldud Wilcoxon'i testiga. Olulised erinevused on märgitud rõhutatud kirjas (p < 0,05).

Tabel 10. HLA riskigruppide seos tsütokiinide kontsentratsioonidega võrdlusgrupi hulgas.

Võrdlusgrupp					
HLA riskigrupp	(0)	(1)	(2)	(3) vähene +	p-väärtus [□]
Tsütokiin	tugev kaitse	mõõdukas kaitse	neutraalne	(4) mõõdukas + (5) tugev risk	
Resistiin (ng/ml)	354 (258-448)	226 (192-417)	258 (207-289)	312 (299-521)	0,211
PAI-1 (ng/ml)	197¹ (158-233)	167² (125-189)	139³ (107-201)	404^{1, 2, 3} (293-408)	0,014
IP-10 (pg/ml)	304 (228-518)	397 (339-476)	371 (291-467)	349 (256-529)	0,791
MCP-1 (pg/ml)	196 (176-277)	221 (169-260)	216 (138-270)	282 (204-301)	0,706
MIP-1β (pg/ml)	18,1 (13,1-21,5)	14,4 (12,4-21,1)	14,4 (13,9-16,9)	22,5 (18,5-28,4)	0,441
GM-CSF (pg/ml)	123 (46,2-265)	39,6 (32,2-114)	39,2 (0,82-57,4)	105 (66,2-157)	0,154
IFN-γ (pg/ml)	12,4 (7,43-17,0)	10,3 (3,82-18,6)	10,7 (5,09-16,6)	12,6 (10,6-23,8)	0,300
IL-10 (pg/ml)	3,89 (0,85-8,16)	4,21 (2,58-7,09)	0,83 (0,22-6,72)	3,84 (1,51-9,17)	0,794
IL-12 (pg/ml)	2,41 (1,71-3,25)	3,21 (0,08-5,38)	2,75 (0,62-3,62)	3,52 (2,80-5,13)	0,371
IL-13 (pg/ml)	4,08 (1,51-8,06)	8,88 (0,16-11,5)	3,85 (2,40-7,08)	11,5 (6,04-17,8)	0,391
IL-17A (pg/ml)	6,33 (2,17-12,2)	3,53 (0,27-15,8)	2,67 (0,76-6,38)	6,23 (2,39-10,7)	0,334

IL-1β (pg/ml)	0,71 (0,09-1,79)	0,45 (0,06-1,39)	0,39 (0,07-0,74)	0,65 (0,29-0,89)	0,653
IL-23 (pg/ml)	53,3 (5,98-103)	7,94 (1,80-81,1)	17,2 (1,80-122)	65,4 (22,3-251)	0,381
IL-5 (pg/ml)	2,59 (1,65-3,95)	1,84 (0,74-5,13)	1,79 (1,11-3,77)	3,33 (2,70-4,28)	0,252
IL-6 (pg/ml)	0,79 (0,63-1,16)	1,13 (0,11-1,71)	0,57 (0,35-0,92)	0,99 (0,75-1,42)	0,339
IL-8 (pg/ml)	5,90^{4,5} (4,47-8,24)	4,13⁴ (3,08-5,06)	3,85⁵ (2,39-6,32)	3,94 (3,05-5,51)	0,045
TNF-α (pg/ml)	4,20 (1,51-8,23)	4,89 (2,13-5,85)	2,36 (0,09-5,10)	3,50 (2,94-4,30)	0,377
sIL-2Rα (pg/ml)	1232 (905-1956)	1061 (991-1757)	782 (594-1181)	689 (606-1116)	0,143
sTNF-RII (ng/ml)	5,93⁴ (5,24-7,04)	7,25^{4,6} (6,50-7,72)	4,74⁶ (3,93-6,68)	5,73 (5,15-6,33)	0,02
TGF-β1 (ng/ml)	15,6 (11,5-23,6)	13,3 (9,05-20,7)	24,6 (15,9-27,5)	25,9 (7,00-33,6)	0,540
TGF-β2 (pg/ml)	733 (520-888)	469 (424-924)	800 (628-982)	888 (451-1141)	0,740
IL-17F (ng/ml)	0,18 (0,06-0,21)	0,06 (0,04-0,13)	0,08 (0,05-0,16)	0,14 (0,11-0,24)	0,477
IL-15 (pg/ml)	39,1 (18,0-73,6)	39,3 (20,8-62,6)	39,1 (23,5-44,7)	44,3 (35,4-69,6)	0,761

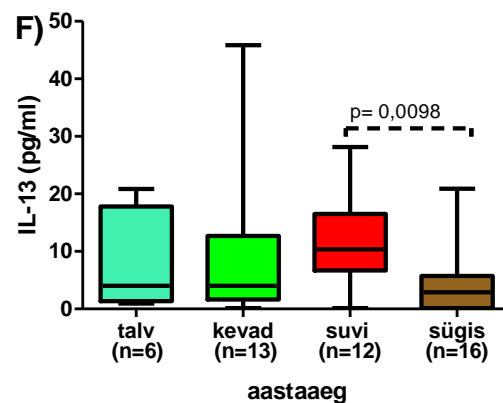
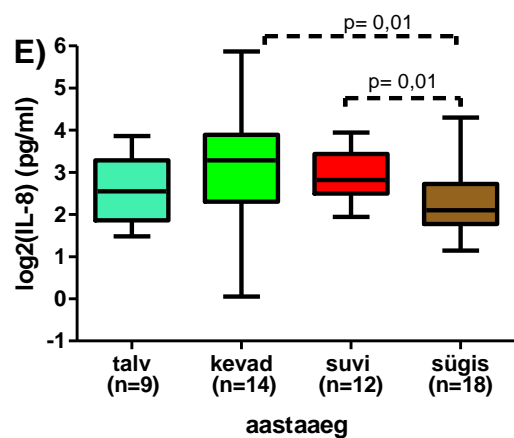
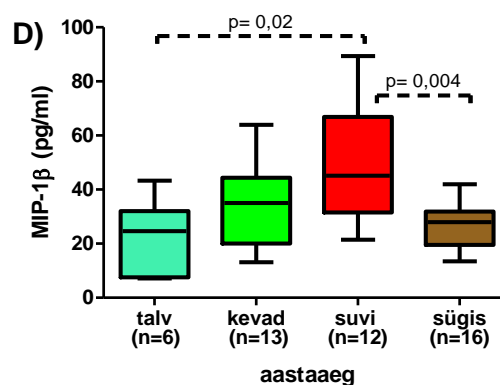
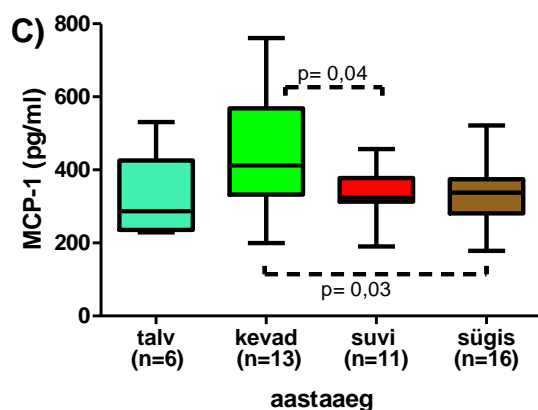
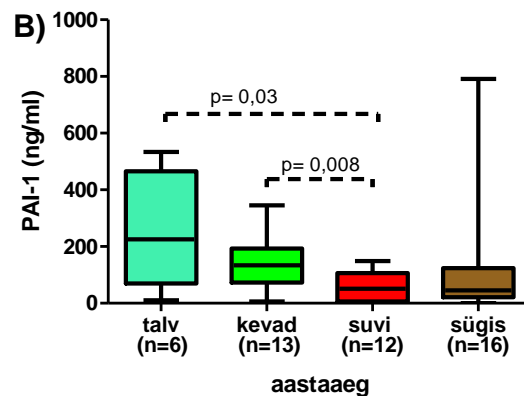
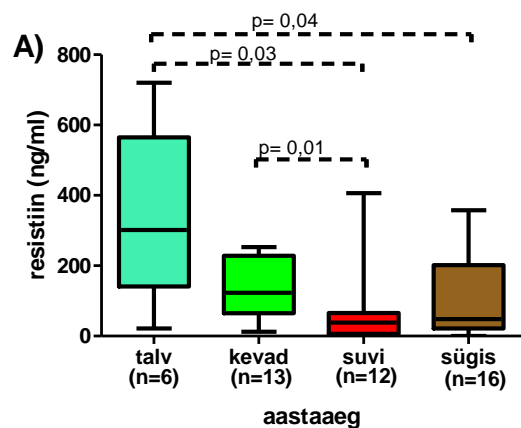
□ - Kruskal-Wallise testi p-väärtus. Tabelis on märgitud mediaanid ning sulgudes esimene ja kolmas kvartiil (IQ1-IQ3). Paaride vahelisi erinevusi on võrreldud Wilcoxon'i testiga. Olulised erinevused on märgitud rõhutatud kirjas ($p < 0,05$). **1** – tugeva kaitse grupp (0) erineb kolmikgrupist (vähene (3), mõõdukas (4) ja tugev (5) risk) (PAI-1); **2** – mõõduka kaitse grupp (1) erineb kolmikgrupist (vähene (3), mõõdukas (4) ja tugev (5) risk) (PAI-1); **3** – neutraalne grupp (2) erineb kolmikgrupist (vähene (3), mõõdukas (4) ja tugev (5) risk) (PAI-1); **4** – tugeva kaitse grupp (0) erineb mõõduka kaitse grupist (1) (IL-8, sTNF-RII); **5** – tugeva kaitse grupp (0) erineb neutraalsest grupist (2) (IL-8); **6** – mõõduka kaitse grupp (1) erineb neutraalsest grupist (2) (sTNF-RII).

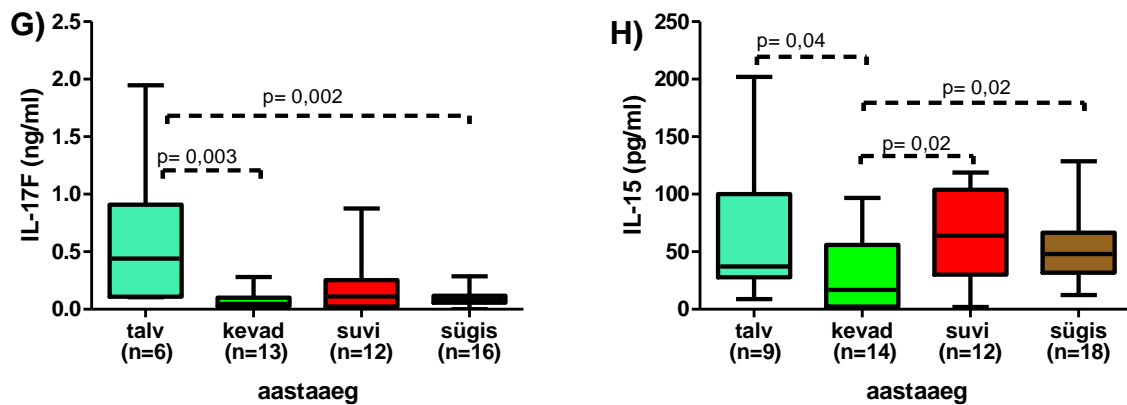
2.3.5 Tsütokiinide kontsentratsioonide seos verevõtu aastaegadega

Tsütokiinide kontsentratsioonide seost aastaegadega vaadeldi eraldi T1D grupis (**lisa 1: tabel 11**) ja võrdlusgrupis (**lisa 1: tabel 12**). T1D grupis leiti mitmeid aastaajast sõltuvaid erinevusi adipokiinide, kemokiinide, põletikutsütokiinide ja IL-17F ja IL-15 tasemete vahel. Adipokiinide, eeskätt resistiini kontsentratsioonid olid talvel kõigi teiste aastaegadega võrreldes kõrgemad. Suvel olid kõrgemad IL-8, IL-13 ja MIP-1 β tasemed võrreldes sügisega. Kevadel aga olid kõrgemad resistiini, PAI-1 ja MCP-1 ning madalamd IL-15 kontsentratsioonid võrreldes suvega. Kevade ja sügise erinevused T1D grupis tulid olulised tsütokiinide IL-8 ja MCP-1 (kevel kõrgemad) ning IL-15 (kevel madalamad) korral. Illustreerivad karp-vurrud diagrammid võib leida joonistelt **7A-7H**.

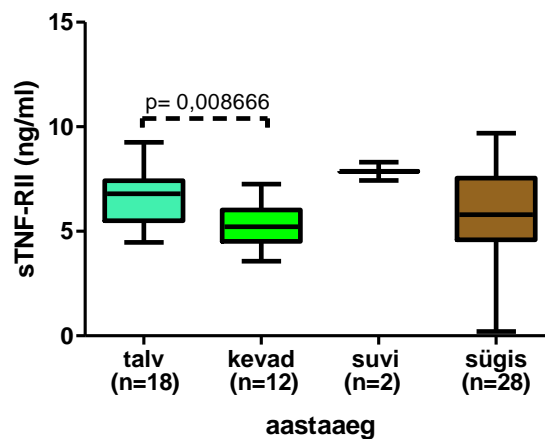
Võrdlusgrupis tuli välja ainult üks oluline erinevus – sTNF-RII tasemed oli talvel kõrgemad võrreldes kevadega (**joonis 8**). Analüüsi piirasid aga võrdlusgrupi uuritavate vähene

arv ($n < 5$) nii suvel kui ka osade tsütokiinide puhul kevadel, mistõttu võisid potentsiaalsed erinevused mitte välja tulla.





Joonis nr 7. Tsütokiinide kontsentratsioonide erinevus haigetel aastaajast sõltuvalt. Paaride erinevust on võrreldud Wilcoxon'i testiga. A) Resistiin B) PAI-1 C) MCP-1 D) MIP-1 β E) IL-8 (logaritmitud) F) IL-13 G) IL-17F H) IL-15. Joonisel on näha minimaalse-maksimaalse pikkusega „vurrud“ ja „karp“, mille sees paikneb 50% tulemustest (piirneb 25% ja 75% kvartiiliga).



Joonis 8. sTNF-RII kontsentratsiooni erinevus sõltuvalt aastaajast võrdlusgrupi hulgas. Joonisel on näha minimaalse-maksimaalse pikkusega „vurrud“ ja „karp“, mille sees paikneb 50% tulemustest (piirneb 25% ja 75% kvartiiliga).

2.3.6 Mudelid

2.3.6.1 Mudelid diagnoosile

Eelnevas analüüsis selgus, et mitmed kofaktorid (näiteks verevõtu aastaag) võivad mõjutada tsütokiinide tulemusi. Selle probleemi lahendamiseks kasutasime statistilisi mudeleid, mis võimaldab tsütokiinide tulemusi „puhastada“ kofaktorite mõjust. **Tabelis 13** võib näha Wilcoxon testi ja kohandatud mudeli p-väärtuste erinevusi diagnoosiga seotud tsütokiinide hulgas. Lineaarsed regressioonimudelid olid kohandatud soole, vanusele, verevõtu aastaajale ja HLA riskigrupile. Peale kohandamist säilisid (võrreldes kohandamata tulemustega) seosed diagnoosi ja resistiini, MCP-1, IL-8 ning sTNF-RII vahel. Uued olulised seosed tekkisid tsütokiinidega IL-12 ja IL-6. Kohandatud mudelites kaotasid diagnoosiga olulised seosed PAI-1, MIP-1 β , IL-10 ja TGF- β 1, kuna suure tõenäosusega on eelmainitud tsütokiinid tugevalt mõjutatud verevõtu aastaajast ja HLA riskigruppidest.

Tabel 13. Diagnoosi seos tsütokiinide kontsentratsioonidega: erinevused Wilcoxon testi ja kohandatud lineaarse regressiooni mudeli vahel.

Tsütokiinid ja diagnoos (võrdlusgrupp vs T1D)			
Tsütokiin	Kohandamata (Wilcoxon test)	Kohandatud*	
	p-väärtus	Regressiooni- kordaja ⁵	p-väärtus
Resistiin ³ (ng/ml)	4,23*10⁻⁷	-177,4	0,002
PAI-1 ³ (ng/ml)	0,0002	-71,9	0,161
IP-10 ¹ (pg/ml)	0,112	-56,7	0,566
MCP-1 ^{1, 2} (pg/ml)	2,32*10⁻⁷	128	0,0008
MIP-1β ^{1, 3} (pg/ml)	2,05*10⁻⁵	5,87	0,199
GM-CSF ⁴ (pg/ml)	0,283	-92,3	0,207
IFN-γ ¹ (pg/ml)	0,424	-3,90	0,135
IL-10 ¹ (pg/ml)	0,03	3,78	0,126
IL-12 ^{1, 3} (pg/ml)	0,247	-1,33	0,03
IL-13 ¹ (pg/ml)	0,885	-0,90	0,707
IL-17A ¹ (pg/ml)	0,473	-0,84	0,701

IL-1β (pg/ml)	0,415	0,24	0,357
IL-23¹ (pg/ml)	0,392	-23,1	0,507
IL-5 (pg/ml)	0,09	0,03	0,960 ¹
IL-6 (pg/ml)	0,127	2,69	0,02
IL-8^{1,3} (pg/ml)	0,01	4,75	0,001
TNF-α⁴ (pg/ml)	0,827	-0,14	0,881
sIL-2Rα² (pg/ml)	0,393	-122	0,498
sTNF-RII¹ (ng/ml)	0,005	1,02	0,03
TGF-β1 (ng/ml)	0,01	7,76	0,187
TGF-β2 (pg/ml)	0,06	182	0,380
IL-17F^{2,3} (ng/ml)	0,607	0,08	0,262
IL-15 (pg/ml)	0,993	2,07	0,868

*Kohandatud soole, verevõtu aastaajale, vanusele verevõtul ja HLA riskigrupile. Oluliselt mõjutavad kofaktorid: ¹HLA; ²sugu; ³verevõtu aastaage; ⁴ vanus; 5 – gruppide keskmiste vahe. Olulised erinevused on märgitud rõhutatud kirjas (p < 0,05).

2.3.6.2 Mudelid ainevahetushäiretele

Analüüsimise ka kofaktorite mõju diabeetiliste ainevahetushäiretega seotud tsütokiinidele, mida võib näha **tabelitest 14** (T1D alagrupid) ja **15** (T1D alagruppide võrdlus võrdlusgrupiga). Analüüsimiseks kasutasime samuti lineaarset regressioonimudelit, mis oli kohandatud soole, vanusele, verevõtu aastaajale ja HLA riskigruppidele. Võrreldes omavahel T1D alagruppe sõltuvalt ainevahetushäire olemasolust tekkisid juurde kolm uut seost – PAI-1, IL-17F ja TGF- β 1. Kõik ülejäänud seosed, mis tulid välja ka Wilcoxonitestiga, jäid samaks. Tabelis 15 jäid ka kohandatud mudelites alles kõik seosed resistiiniga, kuid kadusid ära kõik seosed MIP-1 β . Seoste kadumist mõjutasid kofaktorid HLA ja vanus verevõtul. Uued seosed ainevahetushäirega tekkisid tsütokiinidel IL-10, IL-12, IL-6 ja IL-8.

Tabel 14. Diabeetiliste ainevahetushäirete seos tsütokiinide kontsentratsioonidega: erinevused Wilcoxon'i testi ja kohandatud lineaarse regressiooni mudeli vahel.

Tsütokiinide seos diabeetiliste ainevahetushäiretega (T1D alagruppide vahel)						
Tsütokiin	Ainevahetushäireta vs ainult ketonuuria		Ainevahetushäireta vs ketoatsidoos koos ketonuuriaga		Ainult ketonuuria vs ketoatsidoos koos ketonuuriaga	
	Kohandamata (Wilcoxon'i test)	Kohandatud*	Kohandamata (Wilcoxon'i test)	Kohandatud*	Kohandamata (Wilcoxon'i test)	Kohandatud*
	p-väärtus	Regressiooni- kordaja ⁵ (p-väärtus)	p-väärtus	Regressiooni- kordaja ⁵ (p-väärtus)	p-väärtus	Regressiooni- kordaja ⁵ (p-väärtus)
Resistiin³ (ng/ml)	0,142	-71,2 (0,274)	0,593	51,5 (0,393)	0,021	123 (0,042)
PAI-1^{1,3} (ng/ml)	0,315	-64,4 (0,257)	0,270	110 (0,039)	0,024	174 (0,001)
IP-10¹ (pg/ml)	0,900	-131 (0,313)	0,542	-130 (0,281)	0,517	0,87 (0,994)
MCP-1 (pg/ml)	0,728	45,5 (0,344)	0,187	76,7 (0,093)	0,205	29,1 (0,512)
MIP-1β^{1,3} (pg/ml)	0,667	4,63 (0,442)	0,246	2,50 (0,654)	0,309	-2,13 (0,699)
GM-CSF⁴ (pg/ml)	0,165	163 (0,087)	0,200	105 (0,231)	0,803	-57,5 (0,505)
IFN-γ¹ (pg/ml)	0,786	-2,09 (0,612)	0,856	-2,87 (0,465)	0,774	-0,78 (0,831)
IL-10¹ (pg/ml)	0,490	6,59 (0,089)	0,242	4,35 (0,238)	0,622	-2,25 (0,514)
IL-12¹ (pg/ml)	0,194	0,70 (0,455)	0,553	0,006 (0,995)	0,366	-0,69 (0,407)
IL-13^{1,2} (pg/ml)	0,487	-1,74 (0,581)	0,779	-2,66 (0,366)	0,601	-0,92 (0,751)

IL-17A¹ (pg/ml)	0,071	4,20 (0,217)	0,934	-2,28 (0,481)	0,047	-6,48 (0,034)
IL-1β (pg/ml)	0,173	0,15 (0,719)	0,609	-0,05 (0,906)	0,338	-0,19 (0,597)
IL-23 (pg/ml)	0,173	57,8 (0,294)	0,609	23,3 (0,656)	0,443	-34,5 (0,482)
IL-5 (pg/ml)	0,250	0,97 (0,302)	0,365	0,74 (0,412)	0,806	-0,24 (0,777)
IL-6 (pg/ml)	0,786	-1,40 (0,433)	0,307	-0,62 (0,716)	0,444	0,78 (0,622)
IL-8^{1,3} (pg/ml)	0,320	-2,37 (0,297)	0,087	-1,69 (0,434)	0,221	0,68 (0,737)
TNF-α⁴ (pg/ml)	0,451	1,94 (0,197)	0,510	0,97 (0,498)	0,784	-0,97 (0,467)
sIL-2Rα² (pg/ml)	0,095	-197 (0,404)	0,326	76,0 (0,728)	0,414	273 (0,208)
sTNF-RII¹ (ng/ml)	0,170	-0,80 (0,257)	0,361	0,81 (0,226)	0,008	1,61 (0,011)
TGF-β1 (ng/ml)	0,076	13,5 (0,074)	0,089	14,7 (0,04)	0,855	1,18 (0,863)
TGF-β2 (pg/ml)	0,027	518 (0,046)	0,036	739 (0,003)	0,788	221 (0,347)
IL-17F^{1,2,3} (ng/ml)	1,000	-0,22 (0,023)	0,881	-0,14 (0,121)	0,775	0,08 (0,350)
IL-15 (pg/ml)	0,7856	-0,32 (0,987)	0,948	-2,56 (0,892)	0,967	-2,25 (0,899)

*Kohandatud soole, verevõtu aastaajale, vanusele verevõtul ja HLA riskigrupile. Oluliselt mõjutavad kofaktorid: ¹HLA; ²sugu; ³verevõtu aastaag; ⁴ vanus; 5 – gruppide keskmiste vahe. Olulised erinevused on märgitud rõhutatud kirjas (p < 0,05).

Tabel 15. Diabeetiliste ainevahetushäirete seos tsütokiinide kontsentratsiooniga: erinevused Wilcoxon'i testi ja kohandatud lineaarse regressiooni mudeli vahel.

Tsütokiinid ja diabeetilised ainevahetushäired (võrdlusgrupp vs T1D)						
Tsütokiin	Võrdlusgrupp vs ainevahetushäireta T1D		Võrdlusgrupp vs ainult ketonuuria		Võrdlusgrupp vs ketoatsidoos koos ketonuuriaga	
	Kohandamata (Wilcoxon'i test)	Kohandatud*	Kohandamata (Wilcoxon'i test)	Kohandatud*	Kohandamata (Wilcoxon'i test)	Kohandatud*
	p-väärtus	Regressiooni- kordaja (p-väärtus)	p-väärtus	Regressiooni- kordaja (p-väärtus)	p-väärtus	Regressiooni- kordaja (p-väärtus)
Resistiin ³ (ng/ml)	0,0005	-180 (0,006)	6,05*10⁻⁶	-251 (0,0005)	0,0005	-128 (0,045)
PAI-1 ^{1, 3} (ng/ml)	0,001	-98,1 (0,083)	0,0005	-162 (0,008)	0,056	11,9 (0,828)
IP-10 ¹ (pg/ml)	0,649	27,7 (0,820)	0,388	-103 (0,418)	0,057	-103 (0,382)
MCP-1 (pg/ml)	0,01	87,1 (0,054)	0,001	133 (0,006)	2,59*10⁻⁷	162 (0,0004)
MIP-1β ^{1, 3} (pg/ml)	0,012	3,70 (0,513)	0,002	8,33 (0,162)	0,0002	6,20 (0,256)
GM-CSF ⁴ (pg/ml)	0,885	-175 (0,051)	0,228	-12,5 (0,892)	0,256	-70,0 (0,411)
IFN-γ ¹ (pg/ml)	0,594	-2,21 (0,531)	0,754	-4,29 (0,241)	0,442	-5,08 (0,118)
IL-10 ¹ (pg/ml)	0,382	0,39 (0,905)	0,180	6,98 (0,043)	0,030	4,74 (0,119)
IL-12 ¹ (pg/ml)	0,094	-1,50 (0,062)	0,749	-0,80 (0,332)	0,258	-1,49 (0,043)
IL-13 ^{1, 2} (pg/ml)	0,722	0,58 (0,846)	0,535	-1,16 (0,708)	0,971	-2,08 (0,467)
IL-17A ¹	0,251	-0,90	0,293	3,30	0,184	-3,19

(pg/ml)		(0,755)		(0,274)		(0,233)
IL-1β (pg/ml)	0,739	0,22 (0,527)	0,161	0,37 (0,311)	0,607	0,18 (0,585)
IL-23 (pg/ml)	0,800	-46,7 (0,321)	0,143	11,1 (0,819)	0,632	-23,4 (0,588)
IL-5 (pg/ml)	0,868	-0,51 (0,526)	0,092	0,46 (0,578)	0,143	0,23 (0,760)
IL-6 (pg/ml)	0,994	3,28 (0,033)	0,397	1,88 (0,235)	0,046	2,67 (0,059)
IL-8^{1,3} (pg/ml)	0,954	6,02 (0,002)	0,142	3,65 (0,071)	0,0007	4,33 (0,016)
TNF-α⁴ (pg/ml)	0,432	-1,01 (0,429)	0,816	0,93 (0,484)	0,980	-0,04 (0,970)
sIL-2Rα² (pg/ml)	0,177	-100 (0,653)	0,823	-296 (0,203)	0,429	-23,5 (0,912)
sTNF-RII¹ (ng/ml)	0,121	0,87 (0,148)	0,610	0,71 (0,909)	0,0007	1,68 (0,003)
TGF-β1 (ng/ml)	0,969	-1,41 (0,841)	0,005	12,1 (0,103)	0,013	13,3 (0,052)
TGF-β2 (pg/ml)	0,518	-238 (0,324)	0,018	281 (0,266)	0,039	501 (0,033)
IL-17F^{1,2,3} (ng/ml)	0,937	0,19 (0,032)	0,345	-0,02 (0,789)	0,884	0,06 (0,510)
IL-15 (pg/ml)	0,812	3,21 (0,850)	0,792	2,89 (0,870)	0,980	0,65 (0,967)

*Kohandatud soole, verevõtu aastaajale, vanusele verevõtul ja HLA riskigrupile. Oluliselt mõjutavad kofaktorid: ¹HLA; ²sugu; ³verevõtu aastaag; ⁴vanus; 5 – gruppide keskmiste vahe. Olulised erinevused on märgitud rõhutatud kirjas (p < 0,05).

2.4 Arutelu

Esimest tüüpi diabeet on autoimmuunhaigus, mille põhjustab organismi enda immuunsüsteem, mis asub hävitama pankrease Langerhansi saarekeste insuliini tootvaid β -rakke. Haiguse avaldumise ajaks on β -rakke niivõrd vähe alles jäänud, mistõttu T1D haige sõltub täielikult eksogeensest insuliinist (Atkinson *et al.*, 2014). T1D haigete pankreasest on leitud suur hulk sinna infiltreerunud T_H -rakke ja makrofaage, kuid oluliseks peetakse ka nende rakkude toodetud tsütokiine, mis võivad anda põhilise signaali, et β -rakud tuleb hävitada (Yoon *et Jun*, 2005).

Loomudelites on leitud tsütokiinide ja T1D vahel palju seoseid, kuid inimestes on neid vähem uuritud. Lisaks on tulemused tihtipeale vasturääkivad ja ebajärjekindlad. Samuti on rohkem uuritud tsütokiine üksikult, mitte nende tervet profiili. Multiplekssete määramismeetodite kasutamisele võtmisega on aga hakatud rohkem tähelepanu pöörama sellele, kuidas võiksid T1D haiguse korral mängida rolli just tsütokiinide võrgustikud.

Erinevatest uuringutest järeldub, et T_H1 tsütokiinide (IL-12, IL-2 ja IFN- γ) ja põletikutsütokiinide (TNF- α , IL-1) suurenenud kontsentratsioon seostatakse β -rakke kahjustava insuliidiga. T_H2 (IL-4, IL-10) ja T_H3 (TGF- β) tsütokiinide kõrgeenenud tasemeid aga healoomulise mitte β -rakke kahjustava insuliidiga (Rabinovitch, 1998).

Käesolevas uuringus leiti, et T1D haigetel ja võrdlusgrupil on erinev loomuliku immuunsusega seotud tsütokiinide profiil. T1D haigetel on kõrgemad kemokiinide MCP-1, IL-8 ja IL-6 tasemed, mis vastab kirjanduses toodule. Näiteks on üsna hiljuti leitud, et T1D patsientide MCP-1 tasemed seerumis on kõrgemad võrreldes kontrollidega (Ismail *et al.*, 2016). MCP-1 meelitab monotsüüte/makrofaage pankrease saarekestesse ja initsieerib β -rakkude hävitamise nagu on varasemalt kirjeldanud Martin *et al.* (2008). Erbagci *et al.* (2001) leidsid, et IL-8 tasemed on kõrgemad T1D patsientidel ja IL-6 tasemed on kõrgemad spetsiifiliselt äsja diagnoositud T1D patsientidel, kuid mitte enam hiljem. Leidsime ka, et T1D haigetel on üles reguleeritud anti-inflammatoorsed tsütokiinid - TNF-i lahustuv retseptor TNF-RII, võimalik, et ka IL-10 ja TGF- β (viimased kaks on olulised vaid kofaktoritele kohandamata andmetes). See võib viidata kompensatoorsele efektile, mil üles on reguleeritud nii põletikku pooldavad kui ka alla suruvad tsütokiinid (Ryden *et al.*, 2009; Lohmann *et al.*, 2002). Ka meie leidsime viiteid sarnasele olukorrale, sest lisaks põletikutsütokiinidele liiale leidsime ka immuunvastust reguleerivate tsütokiinide kõrgemad tasemed äsja diagnoositud T1D haigetel.

Vastupidiselt kirjandusele me leidsime T1D grupis vähe nihkeid T_H alatüüpide toodetud tsütokiinide kontsentratsioonides. Ainukeseks oluliseks erinevuseks osutus IL-12 madalam

kontsentratsioon T1D haigetel (peale mudeli kohandamist kofaktoritele nagu sugu, vanus, HLA ja verevõtu aastaag). Hiljuti publitseeriti töö, mis näitas, et T_H1 tsütokiinide profiil prediabeetilises faasis lülitub vahetult enne diabeedi kliinilist avaldumist ümber T_H3 ja põletikuga seotud tsütokiinide profiilile (Ryden *et al.*, 2009). Meie tulemused langevad sellega hästi kokku, sest uurisime äsja diagnoositud noori T1D patsiente, kellele on iseloomulik diabeetiliste ainevahetushäirete sage esinemine (meie populatsioonis ~75% juhtudest).

Meie tööst tuli välja, et T1D grupis on adipokiinide (resistiin) tasemed oluliselt madalamad võrreldes võrdlusgrupiga. Resistiin on üsna hiljuti avastatud adipotsütokiin, mida seostatakse insuliiniresistentsusega. Siiski on tema täpsed mehhanismid rasvumise ja T2D tekkel veel teadmata (Steppan *et al.*, 2001). Resistiini seoseid T1D-ga on vähem uuritud. Ka Schöffler *et al.* (2014) leidsid, et resistiini kontsentratsioonid on T1D haigetel võrreldes kontrollgrupiga madalamad. Valsamakis *et al.* (2004) seostavad mõõdukat kaalukaotust resistiini kontsentratsiooni langemisega. T1D patsiente iseloomustab kaalulangus ja madal C-peptiidi tase (ADA, 2014). Üks hiljutine uuring on aga leidnud vastupidi, et resistiini kontsentratsioonid on hoopis T1D haigetel kõrgemad (Geyikli *et al.*, 2013). Ebakõla võib tulla sellest, et Geyikli *et al.* uuritavate hulka ei kuulunud mitte äsja diagnoositud, vaid kauaaegased T1D patsiendid.

Diabeetiline ketoatsidoos (DKA) on tõsine T1D-ga kaasnev ainevahetushäire, mille korral muudavad maksas produtseeritud ketokehad vere pH eluohtlikult madalaks (Tillmann *et Grünberg*, 2003). Arvatakse, et DKA patofüsioloogiaga on seotud mitmed erinevad tsütokiinid nagu IL-10 (enne ravi alustamist), IL-6, IL-1 β , IL-8 ja TNF- α (Hoffman *et al.*, 2003; Karavanaki *et al.*, 2011).

Antud töö leidis, et nii raskema kui ka kergema (ainult ketonuuria) ainevahetushäire korral on T1D haigetel muutused adipokiinide, T_H17 ja immuunoregulatsiooniga seotud tsütokiinide tasemetes. Näiteks avastasime, et raske ainevahetushäirega patsientidel olid kõrgemad mõlema uuritud adipokiini (PAI-1 ja resistiin) kontsentratsioonid võrreldes nende patsientidega, kellel oli ainult ketonuuria. Ketoatsidoosiga patsiente iseloomustas ka kõrgemad sekretoorse TNF-RII, kuid madalamad IL-17A tasemed.

Huvitavaks leiuks oli see, et ainevahetushäireta T1D ja ketoatsidoosiga patsientide vahel erinesid TGF- β kontsentratsioonid. TGF- β loetakse peamiselt põletikuvastaseks tsütokiiniks ja tal on oluline roll FoxP3-positiivsete indutseeritud reguleerivate T-rakkude genereerimisel (Peng *et al.*, 2004). Lisaks sellele indutseerib TGF- β ka T_H17 rakkude diferentseerumist, mis vastupidiselt soodustab põletiku teket ja kudede remodelleerumist. Viimasega seostatakse ka diabeetiliste hilistüsistuste, eeskätt vaskulaarkomplikatsioonide teket. Arvatakse, et TGF- β roll sõltub kontekstist ehk sellest, mis tüüpi teised tsütokiinid/biomarkerid läheduses domineerivad

(Wahl, 2007). Samuti on leitud kõrge glükoositaseme seos TGF- β taseme suurenemisega (Reinhold *et al.*, 1996).

T1D põhiline erinevus T2D-st on pankrease antigeenide vastaste autoantikehade esinemine. Mitmed uuringud on leidnud, et tsütokiinide tasemetega võib olla seotud teatud diabeedi AAK (Hanifi-Moghaddam *et al.*, 2003; Labikova *et al.*, 2014). Meie uuringust tuli välja, et diabeediga seotud AAK-de ja tsütokiinide vahel oli vähe seoseid. GADA+ T1D haigetel on kõrgemad IL-13 tasemed ja IA-2A+ T1D haigetel olid kõrgemad sekretoorse IL-2R α tasemed. ZnT8 puhul me seoseid ühegi tsütokiiniga ei täheldanud. Uuringud B-raku defitsiidiga haigetel on näidanud, et AAK ei oma T1D tekkes patogeneetilist tähendust (Martin, *et al.*, 2001) ja nende mitte-seotus tsütokiinide dominantse profiiliga on ootuspärane. Kliinilistes katsetes GAD- α l vaktiiniga, mille käigus loodeti kallutada T_H1-T_H2 tasakaalu viimase suunas, näidati, et niinimetatud ravile reageerijaid (ingl *responders*) iseloomustab IL-5 ja IL-13 sekretsiooni tõus (Axelsson *et al.*, 2010). Kõrget IA-2A tiitrit on seostatud ka tsütotoksiliste T-rakkude hulga suurenemist, millega korreleerub IL-17A taseme tõus (Labikova *et al.*, 2014).

Kirjanduses on välja toodud, et rohkem kui ühe AAK esinemine korraga on seotud T1D-sse haigestumise riski tõusuga (Verge *et al.*, 1996). Kuna meie uuritavate hulgas oli vähe neid patsiente, kes olid < 2 AK+, siis me võtsime kokku need patsiendid, kellel tuvastati < 3 erinevat autoantikeha ja võrdlesime neid tsütokiinide tasemete osas T1D patsientidega, kellel oli > 3 AAK-d. Ainuke erinevus tuli välja sekretoorse IL-2R α kontsentratsioonides, mille tasemed olid > 3 AAK+ patsientides hulgas kõrgemad. sIL-2R α on ka varasemalt seostatud AAK (eeskätt IA-2A) tekkega T1D haigetel (Krause *et al.*, 2014), kuid mitte mitmik-AAK esinemisega. IL-2R α rakupinna retseptorina peegeldab T-rakkude aktivatsiooni autoimmuunhaiguste korral (Rubin *et al.*, 1990; Maier *et al.*, 2009). Lahustunud retseptorina on IL-2R α toimet vähe uuritud, kuid on näidatud, et konkureerides IL-2 inhibeerib ta viimase signaali, samas paradoksaalselt suurendades T-rakkude proliferatsiooni (Maier *et al.*, 2009). Siiski ei saa sIL-2R α rolli T1D tekkes lahendatuks pidada, sest T_H aktivatsiooni kõrval on võimalik ka regulatoorsete T-rakkude kaudne toime (IL-2R α on T_{reg}-ide üheks olulises markeriks).

T1D teke on seotud tugevalt HLA-II lookusega (Pociot *et* McDermott, 2002). Meie uuringus HLA riskigrupid T1D patsientide hulgas tsütokiinide kontsentratsioone ei mõjutanud. See-eest võrdlusgrupi hulgas tulid välja mõned üksikud erinevused. Kuna HLA riskigruppe (vähene risk, mõõdukas risk, kõrge risk) leidis võrdlusgrupi patsientide seas oodatult vähem, siis pidime eelmainitud 3 gruppi kokku võtma ja neid koos kaitsvate ja neutraalse grupi vahel võrdlema. PAI-1 tasemed olid kõrgemad riskigruppide hulgas võrreldes neutraalse ja kaitsvate

gruppidega. Varasemalt on leitud, et adipokiinid (leptiin) suurendab IFN- γ tootmise kaudu HLA-II ekspressiooni (Deng *et al.*, 2013). On võimalik, et kõrgenenud HLA ekspressiooni tingimustes esitatakse pankrease autoantigeene paremini, mis omakorda võib soodustada T1D teket. Leidsime ka, et IL-8 ja sTNF-RII oli mõnevõrra kõrgemad kaitsvates HLA gruppides võrreldes riskigruppidega. Varasemalt on viiteid, et T1D kaitsvad HLA haplotüübid seostuvad tervetel lastel kõrgenenud IFN- γ ja IL-2 sekretsioonivõimega vastusena enteroviiruse infektsioonile (Wallden *et al.*, 2008).

On näidatud, et tsütokiinide tasemeid võivad oluliselt mõjutada sellised kofaktorid nagu verevõtu aastaeg (Myrianthefs *et al.*, 2003). Seetõttu uurisime selle faktori mõju tsütokiinide kontsentratsioonidele.

Antud töös tuli välja, et võrdlusgrupis erinevad oluliselt ainult sTNF-RII tasemed talvel võrreldes kevadega. Ülejäänud erinevused ei pruukinud välja tulla, kuna suve ja kevade alagruppides oli liiga vähe patsiente ($n < 5$) ja seetõttu ei saanud me nende gruppidega analüüsi läbi viia. T1D grupis aga olid talvel võrreldes suvega kõrgemad adipokiinide kontsentratsioonid. PAI-1 ja resistiin olid kõrgemad ka kevadel võrreldes sügisega. Kevadel ja suvel võrreldes sügisega olid kõrgemad kemokiinide IL-8 ja MCP-1 ja MIP-1 β tasemed, mis tuleb. Ka kirjanduse andmetel on põletikku soodustavate tsütokiinide tasemed kõrgemad just (vara)suvel, kuigi seda tervete inimeste hulgas. Selline põletikuline profiil tasakaalustub sügisel, mida iseloomustavad madalamad TNF- α ja IL-6 kontsentratsioonid võrreldes teiste aastaaegadega (Myrianthefs *et al.*, 2003). Meie uuring näitas, et tsütokiinide kohandamine kofaktoritele (sugu, vanus, HLA, verevõtu aastaeg) on vajalik, kuna ilmnes mitmeid erinevusi.

Antud uuringul oli mitmeid piiranguid. Mitmel juhul ei olnud võimalik analüüsi läbi viia, kuna uuritavad alagrupid olid liiga väikesed (< 5 isikut). Selline probleem esines näiteks võrdlusgrupis, kus suvel võetud veresid oli vähe. Ka uuritavate jaotamisel HLA riskigruppidesse esines gruppide väiksuse probleem. Tavaliselt leidubki tavapopulatsioonis (võrdlusgrupi) hulgas vähe HLA riskigruppe ja vastupidiselt T1D hulgas väga vähe kaitsvaid allelele. Seetõttu oleks soovitatav edasistes uuringute planeerimisel suurendada valimit ja enam tähelepanu pöörata suvisele proovide võtule.

Üheks töö piiranguks on ka see, et meil puudusid uuritavate lipiidide ainevahetust iseloomustavad näitajad (kehamassiindeks, vere lipiidide profiil). Kuna käesoleva uuringu olulisemad leiud olid just seotud adipotsüütide sekreteeritud tsütokiinidega, siis tuleks edaspidi planeeritavates töödes seda aspekti oluliselt täiendada.

Antud töö tugevuseks võib lugeda selle rangust uuritavate selekteerimisel ja materjali käitlemisel. Näiteks välistasime me uuringust proovid, mis olid üles sulatatud rohkem kui kaks korda. Mitmekordne külmutamine-sulatamine võib tsütokiinide stabiilsust erineval määral

mõjutada (Kisand *et al.*, 2011). Meie uuringusse kaasati vaid „värske“ diagnoosiga lapse ja noorukiea T1D juhud (välistati pikaajalise T1D ja LADA haiged). See on eriti oluline, kuna järjest enam koguneb andmeid, mis näitavad immuunpatoloogia erinevusi diabeedi erinevate vormide vahel ja ka haiguse erinevates ajalistes etappides (dünaamikas).

Edasised uuringud selles vallas võiksid vaadelda tsütokiinide seoseid rasvaainevahetusega ja selle mõju esimest tüüpi diabeedile. Huvitav oleks ka teada, kas T1D haigetel on resistiin ja PAI-1 (ning ka teised adipokiinid) seotud kehamassiindeksiga, mida meie enda uuringus puuduvate kehamassiindeksi näitajate tõttu võimalik analüüsida ei olnud.

2.5 Järeldused

1) Äsja diagnoositud T1D patsientidel on esiplaanil loomuliku immuunsusega seotud tsütokiinide muutused, mis viitab selle süsteemi häirele. Haigetel on tõusnud samaaegselt nii kemokiinide (MCP-1, IL-8) kui ka põletikku reguleeriva lahustuva TNF-retseptori hulk veres. Mõneti üllatav leid oli, et T1D patsientidel on oluliselt madalamad adipotsütokiini resistiini tasemed. Samas me leidsime vähe adaptiivse immuunsusega seotud nihkeid tsütokiinide profiilis, mida on varasemalt kirjeldatud.

2) Diabeetilise ainevahetushäire esinemine seostub loomuliku immuunsuse tsütokiinide ja adipokiinide muutustega vereplasmas. Diabeetilise ainevahetushäirega T1D patsientidel oli ka kõrgem TGF- β tase võrreldes ainevahetushäireta haigetega. Omavahel erinesid samuti kergema (ainult ketonuuria) ja raskema (ketonuuria koos ketoatsidoosiga) ainevahetushäirega T1D patsiendid – ketoatsidoosi iseloomustas adipokiinide (resistiin, PAI-1) ja põletiku regulatsiooniga seotud TNF-retseptori taseme tõus ning T_H17 tsütokiini IL-17A alanenud tase vereplasmas.

3) AAK-de olemasolu seostus üllatavalt väheste tsütokiinidega. GADA positiivsetel T1D haigetel leidsime T_H2 tsütokiini IL-13 kõrgenenud taseme. IA-2A olemasolu ja kolme erinevat tüüpi AAK korraga esinemine seostus sIL-2R α kõrgenenud tasemega (seda retseptorit peetakse rakulise immuunsuse aktivatsiooni üheks markeriks).

4) Diabeedi kõige olulisem geenipiirkond HLA-II ei assotseeru oluliselt tsütokiinide profiili nihetega T1D haigetel. Võrdlusgrupi isikutel esines mõnevõrra kõrgem IL-8 ja sTNF-RII ning madalam PAI-1 tase kaitsvate HLA genotüüpide alagrupis.

5) Verevõtu aastaag mõjutab põletikuga seotud tsütokiinide tasemeid. Leidsime olulise seose sIL-2R α , sTNF-RII ja IL-17F taseme ning verevõtu aastaaja vahel võrdlusgrupis. Lisaks sellele seostus verevõtu aastaag T1D grupis adipokiinide, kemokiinide ja IL-13 (T_H2 tsütokiin) tasemetega. Kofaktorite mõju arvestamine on oluline tsütokiinide analüüsil ja seda võimaldab statistiliste mudelite kasutamine.

KOKKUVÕTE

Tsütokiinid on väikesed peamiselt immuunsüsteemi rakkude poolt toodetud signaalmolekulid, mis avaldavad erinevatele rakutüüpidele mitmesugust mõju. Tsütokiinid võivad muuhulgas suunata immuunrakkude liikumist, suruda alla immuunvastust, põhjustada immuunsüsteemi hüperaktivatsiooni ja osaleda ka erinevate autoimmuunhaiguste tekkes. Tsütokiinid ei toimi üksteisest sõltumatult, vaid keeruka võrgustikuna. Seetõttu on kasulik erinevate haiguste patogeneesis uurida just tsütokiinide profiili.

Esimest tüüpi diabeedi põhjuseks loetakse autoreaktiivseid T-rakke ja makrofaage, mis infiltreeruvad pankreasse, vabastades sealjuures erinevaid tsütokiine. Kirjanduses on palju viiteid selle kohta, et T1D haigetel võib olla häirunud nii T_H1/T_H2 rakkude poolt toodetud tsütokiinide tasakaal, kõrgenenud põletikutsütokiinide, kuid vähenenud anti-inflammatoorsete tsütokiinide osakaal.

Antud töö uuris, milline võiks olla äsja diagnoositud noorte T1D haigete tsütokiinide profiil. Selliseid haigeid iseloomustab juba pöördumatu kahju pankrease insuliini tootvatele rakkudele, mistõttu on nad vajavad insuliinravi. Samuti uuris käesolev töö, milline tsütokiinide profiil võiks iseloomustada diabeetilise ainevahetushäirega T1D patsienti ning kas tsütokiinide tasemed võiksid olla mõjutatud ka erinevatest kofaktoritest nagu aasta-aeg ja indiviidi geneetiline taust.

Antud magistritööst tuli välja, et T1D haigetel on kõrgenenud nii põletikku indutseerivate kui ka seda alla suruvate tsütokiinide kontsentratsioonid. Uudse leiuna aga avastasime, et T1D haigetel on oluliselt madalamad resistiini tasemed, mis vajab kindlasti edasi uurimist. Resistiini ja T1D seose kohta on kirjanduses vähe andmeid ning puuduvate kehamassiindeksite tõttu ei saanud me analüüsida resistiini seost indiviidi kehakaaluga.

Ka raskemat ja kergemat diabeetilist ainevahetushäiret iseloomustavad nihked nii adipokiinide kui ka loomuliku immuunsusega seotud tsütokiinide tasemetes. Ainevahetushäirega T1D patsiente eristas ainevahetushäireta T1D patsientidest kõrgenenud TGF- β tasemed. Meie uuring leidis vähe seoseid HLA ja AAK-de ning tsütokiinide kontsentratsioonide vahel. Tsütokiinide kohandamine aastaajale ja HLA riskigruppidele mõjutas tulemusi oluliselt, mistõttu peaks järgnevatel uurimustel antud kofaktoreid kindlasti arvesse võtma.

SUMMARY

Type 1 diabetes (T1D) is an autoimmune disorder, which is caused by destruction of insulin producing β -cells in pancreas. The main symptom of T1D is hyperglycaemia – excessive amounts of glucose in blood plasma. During the autoimmune attack, the autoreactive T-cells and macrophages infiltrate the pancreas and secrete different kind of small proteins called cytokines. Several types of cytokines can induce the destruction of β -cells or, conversely, down-regulate inflammatory processes.

The role of the cytokines in T1D pathogenesis has been studied much less in humans, and most of the information has come from animal models. Furthermore, the previous works have mostly studied each cytokine individually, but cytokines form a network and affect each other in several ways. New multiplex methods have made possible the detection of multiple cytokines simultaneously in a sample, which is more precise and cost-efficient techniques compared to traditional ELISA. Cytokine levels are affected by many confounders like age, gender and season. One should also be very careful with storage and handling of the samples. Repeated freeze-thaw cycles can easily aggregate or even degrade cytokines.

The main purpose of this thesis was to describe the cytokine profile in the young newly-diagnosed T1D patients. In addition, the intention was to determine whether the levels of cytokines are associated with diabetic metabolism disorders (ketoacidosis or ketonuria) and autoantibodies or affected by confounders like seasons and allelic variants of the human leukocyte antigen (HLA). HLA is the main gene locus associated with T1D.

It was discovered that T1D patients had increased blood levels of chemokines (IL-8, MCP-1) and anti-inflammatory receptor of TNF. Most interesting discovery was that T1D patients had significantly decreased levels of resistin, a cytokine that previously shown to associated with insulin resistance and type 2 diabetes. Furthermore, it was found that diabetic ketoacidosis is mainly associated with cytokines of innate immunity and adipokines. There were few associations between cytokines and diabetic autoantibodies. Confounders like season and HLA strongly affected the significance of results and should be taken into consideration in evaluation of cytokine concentrations.

TÄNUSÕNAD

Soovin tänada eelkõige oma juhendajat, Kalle Kisandit, kellega me pikki vestlusi maha pidasime ja kes suutis minus tekitada huvi statistika vastu. Aitäh ka kaasjuhendajale Viljar Jaksile.

Samuti soovin suure aitäh öelda Aili Tagomale ja Kristi Alnekile, kes juhtisid tsütokiinide määramiste katseid ning kõigile teistele immunoloogia osakonna laborikaaslastele, kes nõuga või jõuga abiks olid.

KASUTATUD KIRJANDUS

Abbas, A. K., Lichtman, A. H. H., and Pillai, S. 2015. Cellular and Molecular Immunology. Elsevier Health Sciences.

Achenbach, P., Koczwara, K., Knopff, A., Naserke, H., Ziegler, A. G., Bonifacio, E. (2004). Mature high-affinity immune responses to (pro)insulin anticipate the autoimmune cascade that leads to type 1 diabetes. *J Clin Invest.* 114(4): 589-97.

(ADA) American Diabetes Association (2003). Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 26(Supplement 1): S5-20

(ADA) American Diabetes Association (2014). Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care.* 37(Supplement 1): S81-S90.

(ADA) American Diabetes Association (2015). Classification and diagnosis of diabetes. Sec. 2. *Diabetes Care.* 38(Supplement 1): S8-S16.

Atkinson, M. A., Eisenbarth, G. S., Michels, A. W. (2014). Type 1 diabetes. *Lancet.* 383: 69-82.

Axelsson, S., Hjorth, M., Akerman, L., Ludvigsson, J., Casas, R. (2010). Early induction of GAD(65)-reactive Th2 response in type 1 diabetic children treated with alum-formulated GAD(65). *Diabetes Metab Res Rev.* 26(7): 559-68.

Barker, J. M., Barriga, K. J., Yu, L., Miao, D., Erlich, H. A., Norris, J. M., Eisenbarth, G. S., Rewers, M. (2004). Prediction of autoantibody positivity and progression to type 1 diabetes: Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY). *J Clin Endocrinol Metab.* 89(8): 3896-902

Barker, J. M., Yu, L., Miao, D., Bao, F., Hoffenberg, E., Nelson, J. C., Gottlieb, P. A., Rewers, M., Eisenbarth, G. S. (2005). Autoantibody "subspecificity" in type 1 diabetes: risk for organ-specific autoimmunity clusters in distinct groups. *Diabetes Care.* 28(4): 850-5.

Barnett, A. H., Eff, C., Leslie, R. D., Pyke, D. A. (1981). Diabetes in identical twins. A study of 200 pairs. *Diabetologia*. 20(2): 87-93.

Bottazzo, G. Z., Florin-Christensen, A., Doniach, D. (1974). Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet*. 2(7892): 1279-83.

Caruso, C., Candore, G., Cigna, D., Colucci, A. T., Modica, M. A. (1993). Biological significance of soluble IL-2 receptor. *Mediators Inflamm*. 2(1): 3-21.

Chatzigeorgiou, A., Harokopos, V., Mylona-Karagianni, C., Tsouvalas, E., Aidinis, V., Kamper, E. F. (2010). The pattern of inflammatory/anti-inflammatory cytokines and chemokines in type 1 diabetic patients over time. *Ann Med*. 42(6): 426-38.

Chen, S., Hong, S. W., Iglesias-de la Cruz, M. C., Isono, M., Casaretto, A., Ziyadeh, F. N. (2001). The key role of the transforming growth factor-beta system in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Ren Fail*. 23(3-4): 471-81.

Christoffersson, G., Rodriguez-Calvo, T., von Herrath, M. (2016). Recent advances in understanding type 1 diabetes. Version 1. 5(F1000 Faculty Rev): 110.

Cucca, F., Lampis, R., Congia, M., Angius, E., Nutland, S., Bain, S. C., Barnett, A. H., Todd, J. A. (2001). A correlation between the relative predisposition of MHC class II alleles to type 1 diabetes and the structure of their proteins. *Hum Mol Genet*. 10(19): 2025-37.

de Jager, W., Bourcier, K., Rijkers, G. T., Prakken, B. J., Seyfert-Margolis, V. (2009). Prerequisites for cytokine measurements in clinical trials with multiplex immunoassays. *BMC Immunol*. 10:52

Deng, T., Lyon, C. J., Minze, L. J., ... Hsueh, W. A. (2013). Class II Major Histocompatibility Complex Plays an Essential Role in Obesity-Induced Adipose Inflammation. *Cell Metab*. 17(3): 411-422.

Erbagci, A. B., Tarakcioglu, M., Coskun, Y., Sivasli, E., Sibel Namiduru, E. (2001). Mediators of inflammation in children with type I diabetes mellitus: cytokines in type I diabetic children. *Clin Biochem*. 34(8): 645-50.

Gaudreau, S., Guindi, C., Ménard, M., Besin, G., Dupuis, G., Amrani, A. (2007). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor prevents diabetes development in NOD mice by inducing tolerogenic dendritic cells that sustain the suppressive function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J Immunol.* 179(6): 3638-47.

Gepts, W., Lecompte, P. M. (1981). The pancreatic islets in diabetes. *Am J Med.* 70: 105-115.

Geyikli, I., Keskin, M., Kör, Y., Akan, M. (2013). Increased Resistin Serum Concentrations in Patients with Type 1 Diabetes Mellitus. *J Clin Res Pediatr.* 5(3): 189-193.

Gregg, R. K., Jain, R., Schoenleber, S. J., Divekar, R., Bell, J. J., Lee, H. H., Yu, P., Zaghoulani, H. (2004). A sudden decline in active membrane-bound TGF-beta impairs both T regulatory cell function and protection against autoimmune diabetes. *J Immunol.* 173(2): 7308-16.

Hanifi-Moghaddam, P., Schloot, N. C., Kappler, S., Seissler, J., Kolb, H. (2003). An association of autoantibody status and serum cytokine levels in type 1 diabetes. *Diabetes.* 52(5): 1137-42.

Hoffman, W.H., Burek, C. L., Waller, J. L., Fisher, L. E., Khichi, M., Mellick, L. B. (2003). Cytokine response to diabetic ketoacidosis and its treatment. *Clin Immunol.* 108(3): 175-81.

Honkanen, J., Nieminen, J. K., Gao, R., Luopajarvi, K., Salo, H. M., Ilonen, J., Knip, M., Otonkoski, T., Vaarala, O. (2010). IL-17 Immunity in Human Type 1 Diabetes. *J Immunol.* 185(3): 1959-67.

Hummel, M., Bonifacio, E., Schmid, S., Walter, M., Knopff, A., Ziegler, A. G. (2004). Brief Communication: Early Appearance of Islet Autoantibodies Predicts Childhood Type 1 Diabetes in Offspring of Diabetic Parents. *Ann Intern Med.* 140(11): 882-6.

Ilonen, J., Kiviniemi, M., Lempainen, J., Simell, O., Toppari, J., Veijola, R., Knip, M. (2016). Genetic susceptibility to type 1 diabetes in childhood – estimation of HLA class II associated disease risk and class II effect in various phases of islet autoimmunity. *Pediatric Diabetes.* 17 (Suppl. 22): 8-16.

Ismail, N.A., Abd El Baky, A.N., Ragab, S., Hamed, M., Hashish, M.A., Shehata, A. (2016). Monocyte chemoattractant protein 1 and macrophage migration inhibitory factor in children with type 1 diabetes. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 29(6): 641-5.

Jensen, R. A., Agardh, E., Lernmark, A., Gudbjörnsdottir, S., Smith, N. L., Siscovick, D. S., Törn, C. (2011). HLA genes, islet autoantibodies and residual C-peptide at the clinical onset of type 1 diabetes mellitus and the risk of retinopathy 15 years later. *PLoS One.* 6(3): e17569.

Jones, A. G., Hattersley, A. T. (2013). The clinical utility of C-peptide measurement in the care of patients with diabetes. *Diabet Med.* 30(7): 803-817.

Jun, H. S., Khil, L. Y., Yoon, J. W. (2002). Role of glutamic acid decarboxylase in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Cell Mol Life Sci.* 59(11): 1892-1901.

Karavanaki, K., Karanika, E., Georga, S., Bartzeliotou, A., Tsouvalas, M., Konstantopoulos, I., Fotinou, A., Papassotiriou, I., Karayianni, C. (2011). Cytokine response to diabetic ketoacidosis (DKA) in children with type 1 diabetes (T1DM). *Endocr J.* 58(12): 1045-53.

Killestein, J., Rep, M. H., Meilof, J. F., Ader H. J., Uitdehaag, B. M., Barkhof, F., van Lier, R. A., Polman, C. H. (2002). Seasonal variation in immune measurements and MRI markers of disease activity in MS. *Neurology.* 58(7): 1077-80.

Kisand, K., Kerna, I., Kumm, J., Jonsson, H., Tamm, A. (2011). Impact of cryopreservation on serum concentration of matrix metalloproteinases (MMP)-7, TIMP-1, vascular growth factors (VEGF) and VEGF-R2 in Biobank samples. *Clin Chem Lab Med.* 49(2): 229-35.

Koczwara, K., Bonifacio, E., Ziegler, A. G. (2004). Transmission of maternal islet antibodies and risk of autoimmune diabetes in offspring of mothers with type 1 diabetes. *Diabetes.* 53(1): 1-4.

Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., Kuchroo, V. K. (2009). IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol.* 27: 485-517.

Kordonouri, O., Klinghammer, A., Lang, E. B., Grüters-Kieslich, A., Grabert, M., Holl, R. W. (2002). Thyroid autoimmunity in children and adolescents with type 1 diabetes: a multicenter survey. *Diabetes Care*. 25(8): 1346-50.

Krause, S., Beyerlein, A., Winkler, C., Gavrisan, A., Kayser, C., Puff, R., Bonifacio, E., Ziegler, A. G., Achenbach, P. (2014). Soluble interleukin-2 receptor alpha in preclinical type 1 diabetes. *Acta Diabetol*. 51(3): 517-8.

Kristiansen, O. O., Mandrup-Poulsen, T. (2005). Interleukin-6 and diabetes: The good, the bad, or th indifferent? *Diabetes*. 54(Supplement 2): S114-24.

Labikova, J., Vcelakova, J., Ulmannova, T., Petruzekova, L., Kolouskova, S., Stechova, K. (2014). The cytokine production of peripheral blood mononuclear cells reflects the autoantibody profile of patients suffering from type 1 diabetes. *Cytokine*. 69(2): 189-95.

Lehr, S., Hartwig, S., Sell, H. (2012). Adipokines: A treasure trove for the discovery of biomarkers for metabolic disorders. *Proteomics Clin Appl*. 6: 91-101.

Lin, H. M., Lee, J. H., Kamaraju, A. K., ... Rane, S. G. (2009). Transforming growth factor-beta/Smad3 signaling regulates insulin gene transcription and pancreatic islet beta-cell function. *J Biol Chem*. 284(18): 12246-57.

Lewis, R. (2000). Diabetic emergencies: Part 2. Hyperglycaemia. *Accident and Emergency Nursing*. 8: 24-30.

Lohmann, T., Laue, S., Nietzschmann, U., Kapellen, T. M., Lehmann, I., Schroeder, S., Paschke, R., Kiess, W. (2002). Reduced expression of Th1-associated chemokine receptors on peripheral blood lymphocytes at diagnosis of type 1 diabetes. *Diabetes*. 51(8): 2474-80.

Long, A. E., Gooneratne, A. T., Rokni, S., Williams, A. J., Bingley, P. J. (2012). The role of autoantibodies to zinc transporter 8 in prediction of type 1 diabetes in relatives: lessons from the European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial (ENDIT) cohort. *J Clin Endocrinol Metab*. 97(2): 632-7.

Maahs, D. M., West, N. A., Lawrence, J. M., Mayer-Davis, E. J. (2010). Chapter 1: Epidemiology of Type 1 Diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 39(3): 481-497.

Maier, L. M., Anderson, D. E., Severson, C. A., Baecher-Allan, C., Healy, B., Liu, D. V., Wittrup, K. D., De Jager, P. L., Hafler, D. A. (2009). Soluble IL-2RA Levels in Multiple Sclerosis Subjects and the Effect of Soluble IL-2RA on Immune Responses. *J Immunol.* 182(3): 1541-1547.

Martin, A. P., Rankin, S., Pitchford, S., Charo, I. F., Furtado, G. C., Lira, S. A. (2008). Increased Expression of CCL2 in Insulin-Producing Cells of Transgenic Mice Promotes Mobilization of Myeloid Cells From the Bone Marrow, Marked Insulinitis, and Diabetes. *Diabetes.* 57(11): 3025-3033.

Martin, S., Wolf-Eichbaum, D., Duinkerken, G., Scherbaum, W. A., Kolb, H., Noordzij, J. G., Roep, B. O. (2001). Development of type 1 diabetes despite severe hereditary B-cell deficiency. *N Engl J Med.* 345(14): 1036-40.

Marwaha, A. K., Crome S. Q., Panagiotopoulos, C., Berg, K. B., Qin, H., Ouyang, Q., Xu, L., Priatel, J. J., Levings, M. K., Tan, R. (2010). Cutting Edge: Increased IL-17–Secreting T Cells in Children with New-Onset Type 1 Diabetes. *J Immunol.* 185(7): 3814-3818.

Mathis, D., Vence, L., Benoist, C. (2001). β -cell death during progression to diabetes. *Nature.* 414(6865): 792-8.

Mohler, K. M., Torrance, D. S., Smith, C. A., Goodwin, R. G., Stremler, K. E., Fung, V. P., Madani, H., Widmer, M. B. (1993). Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists. *J Immunol.* 151(3): 1548-61.

Mäkinen, A., Härkönen, T., Ilonen, J., Knip, M. (2008). Characterization of the humoral immune response to islet antigen 2 in children with newly diagnosed type 1 diabetes. *Eur J Endocrinol.* 159(1): 19-26.

Myrianthefs, P., Karatzas, S., Venetsanou, K., Grouzi, E., Evagelopoulou, P., Boutzouka, E., Fildissis, G., Spiliotopoulou, I., Baltopoulos, G. (2003). Seasonal variation in whole blood cytokine production after LPS stimulation in normal individuals. *Cytokine*. 24(6): 286-92.

Nitta, Y., Tashiro, F., Tokui, M., Shimada, A., Takei, I., Tabayashi, K., Miyazaki, J. (1998). Systemic delivery of interleukin 10 by intramuscular injection of expression plasmid DNA prevents autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *Hum Gene Ther*. 9(12): 1701-7.

Noble, J. A., Valdes, A. M. (2011). Genetics of the HLA Region in the Prediction of Type 1 Diabetes. *Curr Diab Rep*. 11(6): 533-542.

Noble, J. A., Valdes, A. M., Cook, M., Klitz, W., Thomson, G., Erlich, H. A. (1996). The role of HLA class II genes in insulin-dependent diabetes mellitus: molecular analysis of 180 Caucasian, multiplex families. *Am J Hum Genet*. 59(5): 1134-1148.

Opal, S. M., DePalo, V. A. (2000). Anti-inflammatory cytokines. *Chest*. 117(4): 1162-72.

Palmer, J. P., Asplin, C. M., Clemons, P., Lyen, K., Tatpati, O., Raghu, P. K., Paquette, T. L. (1983). Insulin antibodies in insuliin-dependent diabetics before insuliin treatment. *Science*. 222(4630): 1337-9.

Pandiyani, P., Yang, X.-P., Saravanamuthu, S. S., Zheng, L., Ishihara, S., O'Shea, J. J., Lenardo, M.J. (2012). The role of IL-15 in activating STAT5 and fine-tuning IL-17A production in CD4 T lymphocytes. *J Immunol*. 189(9): 4237-4246.

Peng, Y., Laouar, Y., Li, M. O., Green, E. A., Flavell, R. A. (2004). TGF-beta regulates in vivo expansion of Foxp3-expressing CD4+CD25+ regulatory T cells responsible for protection against diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101(13): 4572-7.

Pociot, F., McDermott, M. F. (2002). Genetics of type 1 diabetes mellitus. *Genes and Immunity*. 3: 235-249.

Pugliese, A., Gianani, R., Moromisato, R., Awdeh, Z. L., Alper, C. A., Erlich, H. A., Jackson, R. A., Eisenbarth, G. S. (1995). HLA-DQB1*0602 is associated with dominant

protection from diabetes even among islet cell antibody-positive first-degree relatives of patients with IDDM. *Diabetes*. 44(6): 608-13.

Rabinovitch, A. (1998). An update on cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev*. 14(2): 129-51.

Reetz, A., Solimena, M., Matteoli, M., Folli, F., Takei, K., DeCamilli, P. (1991). GABA and pancreatic beta-cells: colocalization of glutamic acid decarboxylase (GAD) and GABA with synaptic-like microvesicles suggest their role in GABA storage and secretion. *EMBO J*. 10: 1275-1284.

Reinhold, D., Ansorge, S., Schleicher, E. D. (1996). Elevated glucose levels stimulate transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1), suppress interleukin IL-2, IL-6 and IL-10 production and DNA synthesis in peripheral blood mononuclear cells. *Horm Metab Res*. 28(6): 267-70.

Risch, N. (1987). Assessing the role of HLA-linked and unlinked determinants of disease. *Am J Hum Genet*. 40(1): 1-14.

Rubin, L. A., Galli, F., Greene, W. C., Nelson, D. L., Jay, G. (1990). The molecular basis for the generation of the human soluble interleukin 2 receptor. *Cytokine*. 2(5): 330-6.

Ryden, A., Stechova, K., Durilova, M., Faresjö, M. (2009). Switch from a dominant Th1-associated immune profile during the pre-diabetic phase in favour of a temporary increase of a Th3-associated and inflammatory immune profile at the onset of type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. 25(4): 335-43.

Scarano, S., Lisi, S., Ravelet, C., Peyrin, E., Minunni, M. (2016). Detecting Alzheimer's disease biomarkers: From antibodies to new bio-mimetic receptors and their application to established and emerging bioanalytical platforms - A critical review. *Anal Chim Acta*. 940: 21-37.

Schäffler, A., Büchler, C., Müller-Ladner, U., Herfarth, H., Ehling, A., Paul, G., Schölmerich, J., Zietz, B. (2004). Identification of variables influencing resistin serum levels in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Horm Metab Res*. 36(10): 702-7.

Shimada, A., Morimoto, J., Kodama, K., Suzuki, R., Oikawa, Y., Funae, O., Kasuga, A., Saruta, T., Narumi, S. (2001). Elevated serum IP-10 levels observed in type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 24(3): 510-5.

Silverstein, J., Klingensmith, G., Plotnick, L., ... Clark, N. (2005). Care of children and adolescents with type 1 diabetes: a statement of the American Diabetes Association. *Diabetes Care*. 28(1): 186-212.

Singal, D. P., Blajchman, M. A. (1973). Histocompatibility (HL-A) antigens, lymphocytotoxic antibodies and tissue antibodies in patients with diabetes mellitus. *Diabetes*. 22(6): 429-32.

Solimena, M., Dirkx, R., Hermel, J.M., Pleasic-Williams, S., Shapiro, J. A., Caron, L., and Rabin, D. U. (1996). ICA 512, an autoantigen of type I diabetes, is an intrinsic membrane protein of neurosecretory granules. *EMBO J*. 15: 2102–2114

Sosenko, J. M., Skyler, J. S., Palmer, J. P., Krischer, J. P., Cuthbertson, D., Yu, L., Schatz, D. A., Orban, T., Eisenbarth, G. (2011). A Longitudinal Study of GAD65 and ICA512 Autoantibodies During the Progression to Type 1 Diabetes in Diabetes Prevention Trial–Type 1 (DPT-1) Participants. *Diabetes Care*. 34(11): 2345-2437.

Souza, K. L., Gurgul-Convey, E., Elsner, M., Lenzen, S. (2008). Interaction between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in insulin-producing cells. *J Endocrinol*. 197(1): 139-50.

Stenström, G., Gottsäter, A., Bakhtadze, E., Berger, B., Sundkvist, G. (2005). Latent autoimmune diabetes in adults: definition, prevalence, beta-cell function, and treatment. *Diabetes*. 54(Supplement 2): S68-72.

Steppan, C. M., Bailey, S. T., Bhat, S., Brown, E. J., Banerjee, R. R., Wright, C. M., Patel, H. R., Ahima, R.S., Lazar, M.A. (2001). The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*. 409(6818): 307-12.

Zaccone, P., Phillips, J., Conget, I., Gomis, R., Haskins, K., Minty, A., Bendtzen, K., Cooke, A., Nicoletti, F. (1999). Interleukin-13 prevents autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes*. 48(8): 1522-8.

Zhang, L., Eisenbarth, G. S. (2011). Prediction and prevention of Type 1 diabetes mellitus. *J Diabetes*. 3(1): 48-57.

Zhou, X., Fragala, M. S., McElhaney, J. E., Kuchel, G. A. (2010). Conceptual and methodological issues relevant to cytokine and inflammatory marker measurements in clinical research. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 13(5): 541-7

Zimmet, P. Z., Tuomi, T., Mackay, I. R., Rowley, M. J., Knowles, W., Cohen, M., Lang, D. A. (1994). Latent autoimmune diabetes mellitus in adults (LADA): the role of antibodies to glutamic acid decarboxylase in diagnosis and prediction of insulin dependency. *Diabet Med*. 11(3): 299-303.

Zineh, I., Beitelshees, A. L., Silverstein, J. H., Haller, M. J. (2009). Serum monocyte chemoattractant protein-1 concentrations associate with diabetes status but not arterial stiffness in children with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 32(3): 465-7.

Tang, Q., Adams, J. Y., Penaranda, C., Melli, K., Piaggio, E., Sgouroudis, E., Piccirillo, C. A., Salomon, B. L., Bluestone, J. A. (2008). Central role of a defective interleukin-2 production in triggering islet autoimmune destruction. *Immunity*. 28(5): 687-697.

Taplin, C. E., Barker, J. M. (2008). Autoantibodies in type 1 diabetes. *Autoimmunity*. 41(1):11-8.

Thomson, G., Robinson, W. P., Kuhner, M. K., ... Deschamps, I. (1988). Genetic heterogeneity, modes of inheritance, and risk estimates for a joint study of Caucasians with insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Hum Genet*. 43(6): 799-816.

Tillmann, V., Grünberg, H. (2003). Laste diabeetilise ketoatsidoosi ravijuhend. *Eesti Arst*. 82(2): 135-139.

Tran, G. T., Hodgkinson, S. J., Carter, N. M., Verma, N. D., Plain, K. M., Boyd, R., Robinson, C. M., Nomura, M., Killingsworth, M., Hall, B. M. (2012). IL-5 promotes induction of antigen-specific CD4+CD25+ T regulatory cells that suppress autoimmunity.

Trembleau, S., Penna, G., Gregori, S., Giarratana, N., Adorini, L. (2003). IL-12 administration accelerates autoimmune diabetes in both wild-type and IFN-gamma-deficient nonobese diabetic mice, revealing pathogenic and protective effects of IL-12-induced IFN-gamma. *J Immunol.* 170(11): 5491-501.

Tuomi, T., Groop, L. C., Zimmet, P. Z., Rowley, M. J., Knowles, W., Mackay, I. R. (1993). Antibodies to glutamic acid decarboxylase reveal latent autoimmune diabetes mellitus in adults with a non-insulin-dependent onset of disease. *Diabetes.* 42(2): 359-62.

Tuomi, T., Carlsson, A., Li, H., ... Groop, L. C. (1999). Clinical and genetic characteristics of type 2 diabetes with and without GAD antibodies. *Diabetes.* 48(1): 150-7.

Uibo, R., Kisand, K., Peterson, P., Reimand, K. 2015. Immunoloogia. Õpik kõrgkoolidele. Tartu Ülikooli Kirjastus

Umpierrez, G. E., Latif, K. A., Murphy, M. B., Lambeth, H. C., Stentz, F., Bush, A., Kitabchi, A. E. (2003). Thyroid dysfunction in patients with type 1 diabetes: a longitudinal study. *Diabetes Care.* 26(4): 1181-5.

Uno, S., Imagawa, A., Okita, K., ... Shimomura, I. (2007). Macrophages and dendritic cells infiltrating islets with or without beta cells produce tumour necrosis factor-alpha in patients with recent-onset type 1 diabetes. *Diabetologia.* 50(3): 596-601.

van Zee, K. J., Kohno, T., Fischer, E., Rock, C. S., Moldawer, L. L., Lowry, S. F. (1992). Tumor necrosis factor soluble receptors circulate during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor alpha in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89(11): 4845-4849.

Vaughan, D. E. (2005). PAI-1 and atherothrombosis. *J Thromb Haemost.* 3(8): 1879-83.

Verge, C. F., Gianani, R., Kawasaki, E., Yu, L., Pietropaolo, M., Jackson, R. A., Chase, H. P., Eisenbarth, G. S. (1996). Prediction of type I diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies. *Diabetes*. 45(7): 926-33.

Wahl, S. M. (2007). Transforming growth factor-beta: innately bipolar. *Curr Opin Immunol*. 19(1): 55-62.

Wallden, J., Ilonen, J., Roivainen, M., Ludvigsson, J., Vaarala, O. (2008). Effect of HLA genotype or CTLA-4 polymorphism on cytokine response in healthy children. *Scand J Immunol*. 68(3): 345-50.

Wenzlau J. M., Juhl, K., Yu, L., Moua, O., Sarkar, S. A., Gottlieb, P., Rewers, M., Eisenbarth, G. S., Jensen, J., Davidson, H. W., Hutton, J. C. (2007). The cation efflux transporters ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. *PNAS*. 104(43): 17040-17045.

World Health Organization (1999). Definition, diagnosis and classification of Diabetes Mellitus and its Complications: report of a WHO Consultation. Part 1: Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus.

World Health Organization (2006). Definition and diagnosis of Diabetes Mellitus and intermediate hyperglycemia: report of a WHO/IDF consultation.

Yadav, H., Quijano, C., Kamaraju, A. K., ... Rane, S. G. (2011). Protection from obesity and diabetes by blockade of TGF- β /Smad3 signaling. *Cell Metab*. 14(1): 67-79.

Yoon, J.-W., Jun, H.-S. (2005). Autoimmune destruction of pancreatic β cells. *Am J. Ther*. 12: 580-591.

Yu, L., Rewers, M., Gianani, R., Kawasaki, E., Zhang, Y., Verge, C., Chase, P., Klingensmith, G., Erlich, H., Norris, J., Eisenbarth, G. S. (1996). Antiislet autoantibodies usually develop sequentially rather than simultaneously. *J Clin Endocrinol Metab*. 81(12): 4264-7.

Yu, L., Boulware, D. C., Beam, C. A., Hutton, J. C., Wenzlau, J. M., Greenbaum, C. J., Bingley, P. J., Krischer, J. P., Sosenko, J. M., Skyler, J. S., Eisenbarth, G., Mahon, J. L. (2012). Zinc Transporter-8 Autoantibodies Improve Prediction of Type 1 Diabetes in Relatives Positive for the Standard Biochemical Autoantibodies. *Diabetes Care*. 35(6): 1213-1218.

KASUTATUD NETIVIITED

(1) <https://www.med24.ee/andmebaasid/rhk10>

(2) <http://www.endotext.org/>

Gosmanov, A. R., Gosmanova, M.D., Kitabchi, A. E. (2015) Hyperglycemic Crises: Diabetic Ketoacidosis (DKA), And Hyperglycemic Hyperosmolar State (HHS)

LISA 1

Tabel 7. Mediaanide erinevused koos kvartiilidega T1D ja võrdlusgrupis.

Tsütokiin	T1D grupp	Võrdlusgrupp
Resistiin¹ (ng/ml)	75,1 (33,0-214)	299 (238-429)
PAI-1¹ (ng/ml)	84,9 (26,1-156)	194 (139-255)
IP-10 (pg/ml)	273 (191-482)	339 (284-512)
MCP-1² (pg/ml)	338 (288-411)	225 (165-284)
MIP-1β (pg/ml)	31,1 (22,6-42,1)	17,3 (13,6-22,0)
GM-CSF (pg/ml)	79,2 (53,5-144)	70,6 (29,7-132)
IFN-γ (pg/ml)	11,6 (5,98-15,2)	12,1 (6,28-17,4)
IL-10 (pg/ml)	6,98 (2,25-13,6)	3,89 (0,62-7,84)
IL-12 (pg/ml)	2,19 (0,63-3,59)	2,78 (1,22-4,27)
IL-13 (pg/ml)	4,29 (1,35-10,7)	6,09 (1,86-9,24)
IL-17A (pg/ml)	4,16 (1,30-8,25)	4,94 (1,73-11,62)
IL-1β (pg/ml)	0,74 (0,24-1,25)	0,47 (0,07-1,15)
IL-23 (pg/ml)	56,9 (8,77-161)	39,0 (3,15-108)
IL-5 (pg/ml)	3,49 (1,89-5,40)	2,65 (1,57-4,22)
IL-6 (pg/ml)	0,98 (0,45-2,19)	0,79 (0,44-1,33)
IL-8 (pg/ml)	6,12 (4,23-9,80)	4,92 (3,16-6,82)
TNF-α (pg/ml)	3,62 (1,39-5,61)	3,77 (1,44-6,46)
sIL-2Rα (pg/ml)	1077 (917-1458)	991 (705-1605)
sTNF-RII (ng/ml)	6,93 (6,25-7,99)	5,90 (5,04-7,26)
TGF-β1 (ng/ml)	30,3 (13,0-45,1)	19,0 (10,5-26,0)
TGF-β2 (pg/ml)	1088 (582-1446)	735 (444-995)
IL-17F (ng/ml)	0,09 (0,04-0,13)	0,11 (0,04-0,20)
IL-15	37,2	39,6

(pg/ml)	(22,8-68,7)	(22,5-62,4)
---------	-------------	-------------

Tabelis on märgitud mediaanid ning sulgudes esimene ja kolmas kvartiil (IQ1-IQ3); Gruppide võrdlemisel on kasutatud Wilcoxon'i testi. Olulised erinevused on märgitud rõhutatud kirjas ($p < 0,05$).
1 - kaks teadmata väärtust võrdlusgrupis; 2 - üks teadmata väärtus T1D grupis.

Tabel 8. Diabeetiliste ainevahetushäirete seos tsütokiinide kontsentratsioonidega.

Tsütokiin	T1D				Võrdlusgrupp	
	Ketoatsidoos koos ketonuuriaga (3)	Ainult ketonuuria (2)	Ainevahetushäireta (1)	p-väärtus ¹	Ainevahetushäireta (0)	p-väärtus ²
Resistiin (ng/ml)	99,7^{3,4} (46,9-240)	34,6^{3,4} (4,38-101)	119³ (268-216)	0,06	299³ (238-429)	1,7*10⁻⁶
PAI-1 (ng/ml)	120⁴ (50,8-242)	30,3^{4,5} (29,1-141)	91,6⁵ (35,6-126)	0,07	194⁵ (139-255)	0,0004
IP-10 (pg/ml)	245 (186-370)	296 (222-459)	302 (211-536)	0,728	339 (284-512)	0,334
MCP-1 (pg/ml)	377³ (325-412)	314³ (270-384)	326³ (242-385)	0, 270	225³ (165-284)	7,6*10⁻⁶
MIP-1β (pg/ml)	35,0³ (26,7-43,3)	29,6³ (22,9-32,7)	29,4³ (19,2-39,2)	0,387	17,3³ (13,6-22,0)	0,0002
GM-CSF (pg/ml)	95,3 (54,6-144)	76,4 (59,8-179)	58,2 (34,8-118)	0,302	70,6 (29,7-132)	0,364
IFN-γ (pg/ml)	11,4 (6,00-16,0)	12,2 (5,98-16,0)	12,4 (7,63-14,8)	0,936	12,1 (6,28-17,4)	0,859
IL-10 (pg/ml)	11,7 (1,95-18,2)	4,42 (2,25-12,0)	6,98 (2,67-9,48)	0,484	3,89 (0,62-7,84)	0,119
IL-12 (pg/ml)	1,70 (0,40-3,52)	2,35 (0,655,52)	1,79 (0,63-2,35)	0,388	2,78 (1,22-4,27)	0,292
IL-13 (pg/ml)	6,23 (1,16-10,9)	4,13 (0,49-9,78)	4,26 (3,22-10,2)	0,751	6,09 (1,86-9,24)	0,884
IL-17A (pg/ml)	2,98⁴ (0,96-7,10)	6,10⁴ (4,47-12,3)	3,81 (0,23-6,02)	0,084	4,94 (1,73-11,6)	0,152
IL-1β (pg/ml)	0,65 (0,27-1,25)	0,79 (0,59-1,31)	0,38 (0,07-1,19)	0,367	0,47 (0,07-1,15)	0,462
IL-23 (pg/ml)	42,8 (11,3-154)	85,5 (15,4-196)	39,3 (7,15-81,9)	0,419	39,0 (3,15-108)	0,471

IL-5 (pg/ml)	3,45 (2,06-5,55)	4,16 (2,75-5,45)	2,94 (1,59-4,04)	0,491	2,65 (1,57-4,22)	0,237
IL-6 (pg/ml)	1,18 (0,64-2,18)	0,95 (0,42-2,19)	0,63 (0,26-1,51)	0,536	0,79 (0,44-1,33)	0,260
IL-8 (pg/ml)	7,49⁶ (5,82-9,75)	5,19 (4,34-11,2)	4,23 (3,07-7,79)	0,152	4,92⁶ (3,16-6,82)	0,009
TNF-α (pg/ml)	4,17 (1,39-5,62)	3,95 (2,21-6,28)	2,51 (1,28-4,64)	0,699	3,77 (1,44-6,46)	0,853
sIL-2Rα (pg/ml)	1071 (921-1525)	10112 (829-1130)	1388 (1046-1484)	0,238	991 (705-1605)	0,360
sTNF-RII (ng/ml)	7,20^{4,6} (6,64-8,78)	6,32⁴ (5,45-6,93)	7,02 (6,27-8,25)	0,03	5,90⁶ (5,04-7,26)	0,004
TGF-β1 (ng/ml)	31,6⁷ (16,9-48,1)	33,7⁷ (24,8-43,8)	13,6 (8,55-34,0)	0,139	19,0⁷ (10,5-26,0)	0,01
TGF-β2 (pg/ml)	1164^{7,8} (573-1806)	1126^{7,8} (950-1407)	776⁸ (206-1088)	0,05	735⁷ (444-995)	0,02
IL-17F (ng/ml)	0,09 (0,04-0,14)	0,10 (0,06-0,12)	0,08 (0,04-0,22)	0,958	0,11 (0,04-0,20)	0,919
IL-15 (pg/ml)	36,2 (24,3-68,2)	54,6 (14,3-73,7)	34,7 (30,3-65,4)	0,985	39,6 (22,5-62,4)	0,993

1 – Kruskal-Wallise testi p-väärtus, vaadeldud ainult T1D gruppe 1-3. **2** - Kruskal-Wallise testi p-väärtus, analüüsides T1D alagruppe koos võrdlusgrupiga 0. Tabelis on märgitud mediaanid ning sulgudes esimene ja kolmas kvartiil (IQ1-IQ3). Paaride vahelisi erinevusi on võrreldud Wilcoxon'i testiga. Olulised erinevused on märgitud rõhutatud kirjas ($p < 0,05$). **3** – võrdlusgrupp 0 erineb kõigist kolmest T1D grupist (resistiin, MCP-1, MIP-1 β); **4** – grupp 2 (ainult ketonuuria) erineb grupist 3 (ketoatsidoosi ja ketonuuria) (resistiin, PAI-1, IL-17A, sTNF-RII); **5** – võrdlusgrupp 0 erineb gruppidest 1/2 (T1D ainevahetushäireta ja ainult ketonuuria) (PAI-1); **6** – võrdlusgrupp 0 erineb grupist 3 (ketoatsidoosi ja ketonuuria) (IL-8, sTNF-RII); **7** – võrdlusgrupp 0 erineb gruppidest 2/3 (ainult ketonuuria ning ketonuuria ja ketoatsidoosi) (TGF- β 1, TGF- β 2); **8** – grupp 1 (T1D ainevahetushäireta) erineb gruppidest 2/3 (ainult ketonuuria ning ketonuuria ja ketoatsidoosi) (TGF- β 1).

Tabel 11. Verevõtu aastaegade seos tsütokiinide kontsentratsioonidega T1D patsientide hulgas.

Tsütokiin	T1D				p-väärtus [□]
	Talv	Kevad	Suvi	Sügis	
Resistiin (ng/ml)	302^{1, 2} (205-466)	123³ (80,4-217)	38,7^{2, 3} (18,7-55,9)	48,1¹ (25,6-181)	0,015
PAI-1 (ng/ml)	226² (1190-393)	134³ (94,5-172)	51,3^{2, 3} (18,6-92,1)	45,7 (24,2-116)	0,024
IP-10 (pg/ml)	295 (198-360)	245 (213-325)	304 (200-595)	276 (187-583)	0,917
MCP-1 (pg/ml)	287 (240-374)	412^{3, 4} (377-568)	325³ (314-352)	338⁴ (287-373)	0,090
MIP-1β (pg/ml)	24,6² (11,6-27,7)	35,0 (20,3-42,3)	45,1^{2,5} (33,6-63,34)	28,0⁵ (22,3-31,8)	0,009
GM-CSF (pg/ml)	132 (86,2-143)	95,3 (69,4-364)	93,5 (51,7-145)	58,2 (29,7-81,4)	0,118
IFN-γ (pg/ml)	14,5 (10,7-16,9)	11,4 (7,52-15,8)	13,4 (10,8-16,1)	7,13 (2,96-14,2)	0,138
IL-10 (pg/ml)	7,37 (3,99-15,0)	4,64 (1,48-12,3)	11,5 (7,61-18,7)	3,67 (0,28-11,6)	0,223
IL-12 (pg/ml)	1,09 (0,92-2,19)	1,40 (0,14-5,43)	2,90 (1,49-3,53)	2,27 (0,19-2,35)	0,636
IL-13 (pg/ml)	4,04 (2,05-13,7)	4,03 (2,17-9,92)	10,4⁵ (6,77-15,3)	2,89⁵ (0,16-4,78)	0,079
IL-17A (pg/ml)	3,25 (1,69-6,10)	7,71 (0,35-12,5)	4,16 (3,49-6,14)	3,53 (0,23-6,60)	0,602
IL-1β (pg/ml)	0,30 (0,12-1,10)	0,80 (0,40-1,37)	0,97 (0,72-1,26)	0,44 (0,07-0,94)	0,184
IL-23 (pg/ml)	65,8 (20,7-85,5)	102 (1,80-277)	67,6 (38,4-151)	30,7 (3,14-92,1)	0,527
IL-5 (pg/ml)	3,86 (1,89-4,47)	3,87 (2,30-5,94)	4,26 (3,70-5,89)	2,84 (1,39-3,47)	0,107
IL-6 (pg/ml)	1,01 (0,58-1,51)	1,43 (0,53-2,88)	0,97 (0,66-2,49)	0,61 (0,29-1,24)	0,373
IL-8 (pg/ml)	5,86 (4,04-7,75)	9,75⁴ (5,63-14,1)	7,06⁵ (5,74-9,80)	4,29^{4, 5} (3,45-6,03)	0,024
TNF-α (pg/ml)	3,95 (1,17-5,64)	3,87 (2,25-6,52)	3,95 (1,61-5,32)	3,51 (1,45-4,82)	0,884
sIL-2Rα (pg/ml)	1061 (961-1321)	1263 (1071-1578)	1018 (930-1609)	967 (904-1223)	0,650
sTNF-RII (ng/ml)	6,97 (5,79-7,99)	6,94 (6,31-7,73)	7,12 (6,60-7,86)	6,56 (5,81-8,22)	0,846
TGF-β1 (ng/ml)	23,6 (11,3-32,7)	36,9 (16,2-48,6)	30,7 (11,04-44,5)	27,9 (13,3-41,8)	0,777
TGF-β2 (pg/ml)	844 (668-1106)	1164 (914-1545)	994 (432-1248)	1075 (551-1412)	0,635
IL-17F (ng/ml)	0,44¹ (0,17-0,55)	0,05⁶ (0,03-0,09)	0,11 (0,04-0,22)	0,08^{1, 6} (0,06-0,10)	0,014
IL-15 (pg/ml)	37,2⁶ (29,9-73,7)	16,8^{3, 4, 6} (2,99-50,0)	64,0³ (30,2-101)	48,0⁴ (33,5-64,4)	0,047

□ - Kruskal-Wallise testi p-väärtus. Tabelis on märgitud mediaanid ning sulgudes esimene ja kolmas kvartiil (IQ1-IQ3). Paaride vahelisi erinevusi on võrreldud Wilcoxon'i testiga. Olulised erinevused on märgitud rõhutatud kirjas ($p < 0,05$). **1** – talvegrupp erineb sügisgrupist (resistiin, IL-17F) ; **2** – talvegrupp erineb suvegrupist (resistiin, PAI-1, MIP-1 β) **3** – kevadgrupp erineb suvegrupist (resistiin, PAI-1, MCP-1, IL-15); **4** – kevadgrupp erineb sügisgrupist (MCP-1, IL-8, IL-15); **5** – suvegrupp erineb sügisgrupist (MIP-1 β , IL-13, IL-8); **6** – talvegrupp erineb kevadgrupist (IL-17F, IL-15).

Tabel 12. Verevõtu aastaegade seos tsütokiinide kontsentratsioonidega võrdlusgrupi hulgas.

Võrdlusgrupp					
Tsütokiin	Talv	Kevad	Suvi	Sügis	p-väärtus ¹
Resistiin (ng/ml)	312 (244-429)	*	*	299 (248-409)	0,225
PAI-1 (ng/ml)	224 (161-293)	*	*	191 (135-223)	0,262
IP-10 (pg/ml)	295 (213-477)	*	*	430 (314-543)	0,190
MCP-1 (pg/ml)	271 (180-292)	*	*	228 (189-273)	0,095
MIP-1β (pg/ml)	19,6 (14,3-23,1)	*	*	14,4 (12,9-22,3)	0,732
GM-CSF (pg/ml)	132 (61,3-264)	*	*	52,0 (0,89-99,7)	0,110
IFN-γ (pg/ml)	14,3 (6,44-18,0)	11,9 (10,3-14,9)	*	10,5 (5,98-19,6)	0,533
IL-10 (pg/ml)	3,73 (0,83-6,75)	4,84 (0,78-7,67)	*	3,52 (0,22-7,84)	0,432
IL-12 (pg/ml)	2,37 (1,31-3,17)	3,50 (2,73-5,79)	*	2,41 (0,54-3,49)	0,057
IL-13 (pg/ml)	2,99 (1,16-8,47)	*	*	7,24 (2,65-9,49)	0,744
IL-17A (pg/ml)	5,24 (2,81-10,7)	5,81 (2,03-10,5)	*	2,88 (0,44-10,0)	0,180
IL-1β (pg/ml)	0,69 (0,24-1,26)	0,40 (0,07-1,11)	*	0,42 (0,06-0,90)	0,165
IL-23 (pg/ml)	35,9 (2,23-93,8)	38,1 (6,81-182)	*	29,8 (1,80-120)	0,433
IL-5 (pg/ml)	2,37 (1,56-3,37)	2,74 (1,79-4,11)	*	2,59 (1,35-4,17)	0,322
IL-6 (pg/ml)	0,85 (0,52-1,36)	0,92 (0,70-1,30)	*	0,63 (0,30-1,12)	0,105
IL-8 (pg/ml)	4,85 (3,42-6,68)	4,46 (3,71-6,73)	*	5,03 (2,78-6,82)	0,864
TNF-α (pg/ml)	3,97 (1,54-7,28)	3,55 (2,20-4,90)	*	3,34 (0,66-5,75)	0,639
sIL-2Rα (pg/ml)	1406 (912-1690)	*	*	912 (665-1260)	0,037
sTNF-RII (ng/ml)	6,79 (5,57-7,36)	5,22 (4,68-5,86)	*	5,79 (4,69-7,35)	0,040
TGF-β1	15,6	*	*	21,9	0,120

(ng/ml)	(10,7-25,9)			(15,7-25,9)	
TGF-β2 (pg/ml)	733 (431-914)	*	*	846 (618-1218)	0,183
IL-17F (ng/ml)	0,18 (0,10-0,22)	*	*	0,12 (0,06-0,15)	0,048
IL-15 (pg/ml)	34,4 (16,1-98,0)	61,0 (48,6-77,6)	*	39,8 (22,3-49,9)	0,144

*Gruppides liiga vähe uuritavaid, et analüüsi läbi viia (n < 5). 1 - Kruskal-Wallise testi p-väärtus. Tabelis on märgitud mediaanid ning sulgudes esimene ja kolmas kvartiil (IQ1-IQ3). Paaride vahelisi erinevusi on võrreldud Wilcoxon'i testiga. Olulised erinevused on märgitud rõhutatud kirjas (p < 0,05).

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, **Lehte Türk**

(sünnikuupäev: 03.07.1992),

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

„Tsütokiinide profiil äsja diagnoositud esimest tüüpi diabeedi haigetel“,

mille juhendajateks on **Kalle Kisand** ja **Viljar Jaks**

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 31.05.17